

AUS DER KLINIK FÜR GYNÄKOLOGIE, GYNÄKOLOGISCHE ENDOKRINOLOGIE UND
ONKOLOGIE DES UNIVERSITÄTSKLINIKUM GIESSEN UND MARBURG GMBH,
STANDORT MARBURG

(LEITER: PROF. DR. MED. UWE WAGNER)

UND

IN ZUSAMMENARBEIT MIT DER FRAUENKLINIK DES SANA KLINIKUM
OFFENBACH AM MAIN

(CHEFARZT: PROF. DR. CHRISTIAN JACKISCH)

IN KOOPERATION

MIT DEM INSTITUT FÜR PATHOLOGIE DES SANA KLINIKUM OFFENBACH AM

MAIN (CHEFÄRZTIN: DR. MED. SUSANNE BRAUN),

MIT DEM INSTITUT FÜR PATHOLOGIE DER STÄDTISCHEN KLINIKEN DARMSTADT

(LEITER: PROF. DR. GERHARD MAL)

UND

MIT DEM INSTITUT FÜR BIOSTATISTIK UND MATHEMATISCHE MODELLIERUNG

(LEITERIN: PROF. DR. EVA HERMANN) DER JOHANN- WOLFGANG GOETHE

UNIVERSITÄT IN FRANKFURT AM MAIN

Topoisomerase II α als prädiktiver Marker (FISH-Analyse) und der klinische Verlauf beim Mammakarzinom

Eine retrospektive Analyse an 128 Frauen mit
Mammakarzinom aus den Jahren 2003 und 2004

INAUGURALDISSERTATION

zur Erlangung des medizinischen Doktorgrades der gesamten Humanmedizin
dem Fachbereich Medizin der Philipps- Universität Marburg
vorgelegt von

Brigitte Dietzel, geb. Kemper
aus Saarlouis

Marburg, 2016

Angenommen vom Fachbereich der Medizin der Philipps-Universität Marburg
am: 01. März 2016

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Herr Prof. Dr. med. Helmut Schäfer

Referent: Herr Prof. Dr. med. Christian Jackisch

Erster Korreferent: Herr PD Dr. med. Thomas Wündisch

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	2
1.1	Epidemiologie	2
1.2	Gezielte individualisierte Tumorthherapie	3
1.3	Systemische adjuvante Therapie	4
1.4	Etablierte prognostische und prädiktive Marker	8
1.5	Risikoeinstufung	10
1.6	Human Epithelial Growth Factor Receptor 2 (HER2 oder ErbB)	13
1.7	Topoisomerase II α	16
1.8	Untersuchungsmethoden von HER2 und TOP2A	17
1.9	Arbeitshypothese und Fragestellung	18
2	MATERIAL UND METHODEN	21
2.1	Materialien für die histologische Aufarbeitung und Fish-Analyse	21
2.2	Patientenkollektiv	25
2.3	Pathomorphologische Untersuchung	26
2.4	Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH-Analyse)	28
2.5	Mikroskopische Auswertung	31
2.6	Klinische Datenerhebung	32
2.7	Statistische Methoden	33
3	ERGEBNISSE	35
3.1	Patientenkollektiv	35
3.2	Prävalenz der Genaberrationen	42
3.3	Untersuchungen zur Prognose	45
3.4	Untersuchungen zum prädiktiven Wert	52
4	DISKUSSION	61
	Definition des Patientenkollektivs	62
	Untersuchungsmethoden	63
	Prognostische und prädiktive Aussagekraft von TOP2A	66
	Methodenkritik	72
	Schlussfolgerung und Ausblick	75
5	ZUSAMMENFASSUNG	77

6	SUMMARY	79
	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	81
	LITERATURVERZEICHNIS.....	83
	DANKSAGUNG.....	96
	LEBENS LAUF.....	Fehler! Textmarke nicht definiert.
	VERZEICHNIS DER AKADEMISCHEN LEHRER/INNEN:	97
	EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG	Fehler! Textmarke nicht definiert.

1 EINLEITUNG

1.1 Epidemiologie

Brustkrebs ist weltweit und in Deutschland die häufigste maligne Erkrankung der weiblichen Bevölkerung. In der Bundesrepublik erkrankten 2010 70.340 Frauen und 17.466 starben an den Folgen dieser Erkrankung. Für das Jahr 2014 wurden 75.200 Neuerkrankungen erwartet [95], [97]. Weltweit sind 2008 etwa 1,4 Millionen Menschen an Brustkrebs erkrankt, 458.400 sind daran verstorben. Damit ist das Mammakarzinom das am häufigsten zum Tode führende Malignom [16], [109].

Die Inzidenz ist in den westlichen Industrienationen am höchsten, so in Deutschland mit 120 oder den USA mit 101 Neuerkrankungen je 100.000 Einwohner. Die durchschnittliche Inzidenz der Entwicklungsländer liegt dagegen bei 27,3 /100.000 Frauen [16], [61].

Seit Anfang der 80er Jahre ist die Inzidenz vor allem in Westeuropa und Nordamerika um 30% gestiegen. Dies wird auch auf die Einführung des Mammographie-Screenings zurückgeführt. Dieser Effekt ist, wenn auch weniger ausgeprägt, ebenso in Afrika und Asien zu verzeichnen [16], [61], [95], [97].

Zu den wichtigsten Risikofaktoren gehören das Alter, Geschlecht und die Familienanamnese. Mit steigendem Alter nimmt das Risiko an Brustkrebs zu erkranken zu und ist in der Gruppe der 70- bis 75-jährigen am höchsten. Das mittlere Erkrankungsalter liegt bei 61 Jahren. Nur jede 4. Frau ist jünger als 55 Jahre. Jedoch 50% der erkrankten Frauen sind jünger als 61 Jahre und damit im Vergleich zu anderen Neoplasien relativ jung. Das Mammakarzinom ist die häufigste Todesursache bei Frauen zwischen 35 und 54 Jahren [97], [17].

Umweltfaktoren und Veränderungen der Lebens- bzw. Familienplanung, die die endogene Hormonexposition steigern, begünstigen die Entstehung von

Brustkrebs: Nulliparität, späte Primiparität, frühe Menarche sowie späte Menopause, orale Kontrazeption und postmenopausale Hormonersatztherapie fördern die Karzinombildung. Stillen dagegen wirkt protektiv. Allgemein erkrankungsbegünstigend wirken eine erhöhte Exposition gegenüber radioaktiver Strahlung, fettreiche Ernährung, Adipositas, körperliche Inaktivität, Nikotin und übermäßiger Genuss von Alkohol [17].

Frauen, die bereits an Brustkrebs erkrankten, weisen ein lebenslang erhöhtes Erkrankungsrisiko für ein kontralaterales Mammakarzinom auf. Das Risiko im Vergleich zu einer gleichaltrigen unbelasteten Frau ist um 67% erhöht [12], [110].

Auf Grund der Früherkennung sowie der verbesserten Therapieoptionen ist die Mortalität trotz steigender Inzidenz seit über zwanzig Jahren stabil bzw. in den Industrienationen tendenziell rückläufig [110], [97]. Vor allem die Mortalitätsrate der jüngeren Frauen konnte zwischen 1980 und 1992 um bis zu 33,33% gesenkt werden [97].

Die Prognose ist insbesondere in frühen Stadien hervorragend. Die relative 5-Jahresüberlebensrate (5-JÜR) wird derzeit in Deutschland auf 83-87% geschätzt. Dennoch hat die einmal an Brustkrebs erkrankte Frau auch noch nach Jahren ein erhöhtes Mortalitätsrisiko. In den frühen Stadien hat sich die Prognose auch hinsichtlich des Langzeitüberlebens verbessert. Ende der 1970er Jahre belief sich die 10-JÜR im T1-Stadium auf etwa 83%, Anfang 2000 lag sie schon über 93%. Auch im T2-Stadium konnte die 10-JÜR von 78% auf 85% gesteigert werden. Für T3- und T4-Stadien ist die 10-JÜR jedoch gleich bleibend bei etwa 40% [96], [17].

1.2 Gezielte individualisierte Tumorthherapie

Im letzten Jahrzehnt hat sich mehrheitlich die personalisierte und gezielte Medizin als Ausdruck der maßgeschneiderten Behandlung etabliert. Das individuelle Rückfallrisiko wird mittels spezifischer Tumorcharakteristika festgestellt. Um

dieses Risiko zu senken, werden anhand dieser Merkmale die adjuvanten Therapien ausgesucht und zusammengestellt.

Das Mammakarzinom stellt eine heterogene Erkrankung dar. Nicht nur in den individuellen Parametern, wie Alter, Menopausenstatus oder Komorbiditäten, sondern auch in der speziellen Tumorbilogie (histopathologische Parameter, Hormonsensitivität, Invasivität usw.) unterscheiden sich die Patientinnen erheblich. In den großen klinischen Studien, die bisher ausschlaggebend für die Behandlungsindikation waren, wurde die Heterogenität der Erkrankung wenig oder gar nicht berücksichtigt. Der Kliniker stand/steht vor der schweren Aufgabe, diese verallgemeinernden Ergebnisse auf die individuelle Patientin zu übertragen. Wegen des verbesserten Langzeitüberlebens ist es jedoch unbedingt notwendig, den Überlebensvorteil durch die Tumorthherapie gegen deren Langzeitschaden abzuwägen [87], [90], [46].

1.3 Systemische adjuvante Therapie

Taxane und Anthrazykline stellen das Rückgrat der adjuvanten Chemotherapie dar. Viele Studien der letzten Jahre haben die Überlegenheit dieser Substanzgruppen untermauert [128], [28], [30]. Im Rahmen der Oxford Overviews (EBCTCG) konnte wiederholt gezeigt werden, dass die anthrazyklinbasierte Polychemotherapie das Überleben signifikant verbessert. Unter Chemotherapie mit einem Anthrazyklin konnte die kumulative 15-Jahres-Morbiditätsrate um 30% gesenkt werden. Durch die Metaanalysen der EBCTCG aus dem Jahr 2005 konnte die Überlegenheit der anthrazyklinbasierten Regime gegenüber der CMF-Chemotherapie nachgewiesen werden [28]. Seither haben sich verschiedene anthrazyklinbasierte Regime im klinischen Alltag etabliert. Darüber hinaus hielten die Taxane Einzug in die Tumorthherapie. Unabhängig vom Nodalstatus profitieren Patientinnen mit ungünstigen Zusatzkriterien von einer taxanhaltigen Chemotherapie, so dass die modernen Regime in der Regel sowohl ein Anthrazyklin als auch ein Taxan enthalten [88].

Bei HER2-positiver Erkrankung erhält die Patientin im Anschluss an eine zumeist anthrazyklin- und taxanbasierte Chemotherapie eine einjährige Therapie mit dem monoklonalen humanisierten Antikörper Trastuzumab (Herceptin®). Die Kombination von Trastuzumab mit einem Anthrazyklin geht mit vermehrten kardiotoxischen Nebenwirkungen einher, so dass von der simultanen Therapie beider Substanzen abgeraten wird. Auch aus diesem Grunde ist es von Bedeutung, die Patientinnen, die einen besonderen Vorteil von Anthrazyklinen haben, zu identifizieren. Derzeit wird diese Therapie bei Karzinomen mit einer Tumorgroße jenseits der 10 mm empfohlen [46], [69].

1.3.1 Anthrazykline

Zu den Anthrazyklinen gehören Epirubicin, Doxorubicin (früher: Adriamycin), Idarubicin und Daunorubicin [58]. Epirubicin (E) und Doxorubicin (A) sind die in der Zytostatikatherapie des Mammakarzinoms etablierten Anthrazykline [29]. Die Minstdosisintensität beträgt für Doxorubicin 20mg/m²/Woche und für Epirubicin 30mg/m²/Woche [69].

Regime	Substanz und Dosierung				Zyklen
EC	90mg/m ²	Epirubicin	und	600mg/m ²	4 oder 6x alle 3 Wochen
	Cyclophosphamid iv d1				
FEC	500-600 mg/m ²	Cyclophosphamid,	100mg/m ²		4 oder 6x alle drei Wochen
	Epirubicin, 500-600mg/m ² 5- Fluorouracil iv d1				
CMF	500mg/m ²	Cyclophosphamid,	600mg/m ²	5-	6x je am 1. und 8. Tag alle vier Wochen
	Fluorouracil, 70mg/m ² Metotrexat i.v. d1 und 8				
TAC	500mg/m ²	Cyclophosphamid,	50mg/m ²	Doxirubicin,	Alle 3 Wochen
	75mg/m ² Paclitaxel i.v. d1				

Tabelle 1 Chemotherapie regime und Dosierschemata

Wirkmechanismus

Die DNA-Topoisomerase-Komplexe, die während der Replikation bzw. Transkription von der Topoisomerase II α gebildet werden (s. auch Abschnitt 1.6

Topoisomerase II α), werden von den Anthrazyklinen stabilisiert. Es kommt zu vielfachen persistierenden Doppelstrangbrüchen. Diese stellen eine Störung der genomischen Integrität dar. Physiologischerweise handelt es sich um einen flüchtigen Zustand, der in niedriger Konzentration von der Zelle toleriert wird. Erhöht sich diese Konzentration und verlängert sich die Dauer der DNA-Brüche, wird eine genetische Instabilität verursacht, die mit schweren Aberrationen wie Austausch von Schwesterchromatiden, Insertionen und Deletionen einhergeht und letztlich zum programmierten Zelltod führt [56], [117], [98].

Nebenwirkungen

Zu den akuten und subakuten Nebenwirkungen der Anthrazykline gehören neben Übelkeit, Erbrechen, Haarausfall, Leukopenie und Stomatitis auch neuropathische Beschwerden, ausgeprägte Myalgien und Nagelveränderung [7]. Daneben gibt es zwei schwerwiegende langfristige Anthrazyklin assoziierte Nebenwirkungen, die die Morbidität bzw. Mortalität der Patientin nach erfolgreicher Therapie erhöhen können. Dazu gehören die akute myeloische Leukämie (AML) sowie die irreversible Kardiotoxizität [27].

Assoziierte Substanzen	Dosis	Mediane Latenz	Prodromal stadium	Patho-mechanismus
Topoisomerase II α -Inhibitoren, z.B. Anthrazykline	unabhängig	1-3 Jahre	ohne	Balancierte Chromosomen-aberration
DNA alkylierende Substanzen, z.B. Cyclophosphamid	dosisabhängig	4-6 Jahre	MDS	Unbalancierte Chromosomen-aberration

Tabelle 2 Chemotherapie assoziierte myeloische Erkrankungen [126]

Sekundäre myeloische Erkrankungen sind relevante Spättoxizitäten der adjuvanten Polychemotherapie [126]. Dabei wird die Anthrazyklin assoziierte von der Cyclophosphamid assoziierten akuten myeloischen Leukämie unterschieden. Bei der Anthrazyklin assoziierten Leukämie handelt es sich um das häufigste

therapieinduzierte Zweitmalignom. Das Risiko, daran zu erkranken, ist in den ersten zehn Jahren nach Chemotherapie am höchsten [66]. Da die Anthrazykline fast immer mit Cyclophosphamid kombiniert werden (s. Tabellen 1 und 24), ist die Patientin einem erhöhten Risiko für eine therapieinduzierte myeloische Erkrankung ausgesetzt [126].

Die Anthrazyklin assoziierte Kardiotoxizität ist insbesondere für Frauen mit HER2-positiver Erkrankung bedeutsam, die durch die anti-HER2-Therapie ein weiteres kardiotoxisches Medikament erhalten. Dabei handelt es sich um zwei verschiedene Entitäten der chemotherapiebedingten kardialen Dysfunktion (chemotherapy related cardiac dysfunction/ CRCD) [38], [114]. Die CRCD I wird durch Anthrazykline verursacht: Durch die Bildung freier Sauerstoffradikale kommt es zur strukturellen Myozytenschädigung. Dieser Prozess, der vermutlich nicht am antineoplastischen Effekt beteiligt ist, kann histologisch nachgewiesen werden und ist irreversibel [67]. Der wichtigste Risikofaktor für eine CRCD I ist die kumulative Dosis. Ab einer kumulativen Dosis von 550mg/m² steigt das Risiko auf 7-16% für eine Anthrazyklin assoziierte Herzinsuffizienz an [53], [114]. Bei höherem Lebensalter und vorgeschädigter Myocardfunktion (gemessen an der LVEF) ist auch eine geringere kumulative Dosis von 400mg/m² ausreichend, um das Risiko für die CRCD I zu erhöhen [114]. Weitere bekannte Risikofaktoren sind die Frequenz und Dauer der Behandlung bzw. die Formulierung des Wirkstoffs [36]. Die Symptomatik reicht von Beschwerdefreiheit bis zu schwerer Herzinsuffizienz. Auch wenn Herz und Kreislauf über Kompensationsmechanismen verfügen, bleibt die myokardiale Schädigung nach Abschluss der Therapie bestehen und macht die Patientinnen während ihres weiteren Lebens für erneute myokardiale Belastungen, wie Myokardinfarkt, Infektionen, Medikamente, Alter usw. ,vulnerabel [36].

Die CRCD II wurde bisher nur im Zusammenhang mit der Trastuzumab-Therapie beobachtet. Sie wird zumindest teilweise durch die Blockade des HER2-Signalweges verursacht [36]. Über diesen Signalweg werden wichtige Impulse für Wachstums- und Reparaturmechanismen der Myozyten übermittelt, die die Kontraktilität, Funktion und Struktur des Herzmuskels erhalten. Der detaillierte

Pathomechanismus am HER2-Signalweg ist noch nicht ganz verstanden. Jedoch ist bekannt, dass über diesen Signalweg eine dilatative Kardiomyopathie verhindert wird [76], [11]. Die CRCD II ist nicht dosisabhängig. Sie tritt nicht regelhaft auf und kann sich in verschiedensten Schweregraden äußern [86]. In der Regel kommt es zu keiner strukturellen Herzmuskelschädigung [35]. Im Gegensatz zur CRCD I ist sie überwiegend reversibel, so dass es nach Absetzen des Medikamentes innerhalb von 2 bis 4 Monaten zur meist vollständigen Erholung kommt [108], [113]. Die CRCD II tritt bei bis zu 3,8% der Patientinnen im Rahmen einer Therapie mit dem Antikörper Trastuzumab auf. Diese Rate steigt signifikant auf bis zu 19% an, wenn im Vorfeld Anthrazykline verabreicht worden sind [108]. Dies bestätigt die Annahme, dass die myokardiale Schädigung durch die Anthrazykline zu einer reduzierten Kompensationsfähigkeit des Herzens führt [37].

1.4 Etablierte prognostische und prädiktive Marker

Prognostische Marker geben Aufschluss über den Krankheitsverlauf und das zu erwartende Überleben. Prädiktive Marker erlauben Aussagen über den zu erwartenden Therapieerfolg einer spezifischen Behandlung. Eine Kombination aus beiden führen zur Optimierung der individualisierten adjuvanten Therapie.

Prognostische und prädiktive Marker müssen bestimmte Kriterien erfüllen, um für den klinischen Alltag geeignet zu sein. Sie müssen zusätzliche Information über Verlauf und/oder Therapieeffekte liefern können, die durch die bekannten Marker nicht oder in geringerem Ausmaße verfügbar sind. Die Patientengruppe, für die der Marker relevant und aussagekräftig ist, muss definiert sein. Ihre Unabhängigkeit muss durch multivariate Analyse geprüft worden sein. Die Untersuchungsmethode muss standardisiert und verfügbar sein. Desweiteren muss ein entsprechendes Kosten-Nutzen-Verhältnis bestehen [71].

Zu den etablierten prognostischen und prädiktiven Markern des Mammakarzinoms gehören Alter, TNM-Klassifikation, histopathologisches Grading, der Hormon- und der HER2-Rezeptorstatus. Eine Zusammenfassung der prognostischen und prädiktiven Marker stellt die Risikoeinschätzung für einen Erkrankungsrückfall, beispielsweise nach den Empfehlungen der St. Gallen Konsensuskonferenzen dar. Das Ausmaß der adjuvanten Therapie richtet sich somit nach der Wahrscheinlichkeit eines zu erwartenden Erkrankungsrückfalls, der lokal, kontralateral oder distant in Form von Fernmetastasen auftreten kann.

1.4.1 Alter

Die unter vierzigjährigen Frauen machen nur 6% der an Brustkrebs erkrankten Patientinnen aus. Das junge Alter geht mit einer aggressiven Tumorbilogie und somit mit einem erhöhten Rückfallrisiko einher. Beim Vergleich prämenopausaler Frauen mit hormonrezeptorpositiver Erkrankung zeigte sich, dass die unter 35-jährigen kürzere Überlebenszeiten als die älteren prämenopausalen Frauen aufwiesen [1], [42]. Nach aktueller Einschätzung gehen Kliniker bei einer unter 35-jährigen Patientin immer von einem hohen Rückfallrisiko aus [44].

1.4.2 TNM-Klassifikation

Die TNM-Klassifikation erfasst u.a. die Tumorgroße, die Anzahl der befallenen Lymphknoten und das Vorhandensein bzw. Fehlen von Metastasen. Seit der Einführung der TNM-Klassifikation in der Mitte des 20. Jahrhunderts wurde deren prognostische Bedeutung wiederholt in Studien evaluiert. Die Studien stimmen überein, dass die Überlebenszeiten mit Größenzunahme und/oder der Anzahl der Lymphknotenmetastasen abnehmen [10], [83], [8], [52], [74]. Von beiden Faktoren hat sich der Lymphknotenstatus als der wichtigere herauskristallisiert, aber auch weiter differenziert. Bis 2005 galt jede Patientin mit Lymphknotenbefall ungeachtet aller anderen Kriterien als Hochrisiko-Patientin. Seit 2005 wird die Anzahl der Lymphknotenmetastasen differenziert und in Zusammenhang mit weiteren Kriterien, allen voran dem HER2- und Hormonrezeptorstatus, zur Beurteilung herangezogen [44].

1.4.3 Histopathologisches Grading

Das histopathologische Grading erfasst die Entdifferenzierung der Tumorzelle und gilt als Maß für die Aggressivität eines Tumors. In vielen Studien wurde der Differenzierungsgrad mit dem Überleben korreliert. Es wurde gezeigt, dass die Entdifferenzierung mit verkürzten Überlebenszeiten einhergeht, und sie hat sich somit als prognostischer Marker etabliert [8], [74], [106], [52].

1.4.4 Hormonrezeptorstatus

Zwei Drittel aller Mammakarzinome exprimieren Östrogen- und/oder Progesteronrezeptoren [4]. Die Early Breast Cancer Trialists' Group untersuchte in einer Metaanalyse das Überleben von 33.000 Frauen, die in randomisierten Studien zur endokrinen Therapie eingeschlossen waren. Die Tamoxifentherapie für 5 Jahre reduzierte das relative Risiko um 30% in den ersten 15 Jahren. Der Benefit dieser Therapie war auf Patientinnen mit positivem Östrogenrezeptorstatus beschränkt, und zwar ungeachtet aller anderen Parameter. Der Östrogenrezeptor ist ein starker Prädiktor für die systemische endokrine Therapie [14], [44].

1.5 Risikoeinstufung

Die Risikoeinstufung erfolgt in drei Gruppen und gibt Hilfestellung, ob und welche Art der Therapie erforderlich ist [45], [47], [26]. Die Risikoprofile wurden im Laufe der Jahre den neuesten Erkenntnissen immer wieder angepasst. 2003 waren noch alle lymphknotenpositiven Frauen Hochrisiko-Patientinnen, bei denen meist eine Chemotherapie indiziert war (Tab. 3) [43].

pN- Status	Niedriges Rezidivrisiko	Mittleres Rezidivrisiko	Hohes Rezidivrisiko
pN0	<u>Alles muss erfüllt sein:</u> ER und /oder PR pos pT1 G1 ≥35 Jahre	<u>Mind. ein Kriterium erfüllt:</u> ER und PR neg oder ≥pT2 oder G2-3 oder < 35 Jahre	
pN positiv			immer

Tabelle 3 Risikoeinstufung nach St. Gallen Konsensus Konferenz 2003 [43]

2005 wurde der HER2-Status aufgenommen und der Lymphknotenstatus nach Anzahl der befallenen Lymphknoten differenziert, so dass derselben Patientin unter gewissen Voraussetzungen nun eine zytostatische Therapie erspart blieb (Tab. 4) [44].

pN Status	Niedriges Rezidivrisiko	Mittleres Rezidivrisiko	Hohes Rezidivrisiko
pN0	<u>Alles muss erfüllt:</u> pT <2cm und G1 und V0 und ER und PR + und HER2 – und ≥ 35 Jahre	<u>Mind. ein Kriterium erfüllt:</u> pT <2cm oder G2-3 oder V1 oder ER und PR – oder HER2 + oder <35 Jahre	nie
pN+ (bis 3 LK)		ER und/ oder PR + und HER2 negativ	ER und PR negativ oder HER2 positiv
pN+ (≥4 LK)			immer

Tabelle 4 Aktuelle Risikoeinstufung nach St. Gallen Konsensus Konferenzen 2007 [44]

Die Einteilung von 2007 ermöglicht eine gute Einschätzung des individuellen Rückfallrisikos. Zur Indikationsstellung einer Chemotherapie ist sie jedoch nur bedingt geeignet. Bei Patientinnen mit einem hohen Rückfallrisiko ist eine

Chemotherapie indiziert, für Patientinnen mit niedrigem Risiko ist diese Therapie nicht erforderlich. Für den Großteil der Patientinnen, nämlich die mit einem mittleren Rückfallrisiko, ist immer noch keine verlässliche Aussage möglich. Aus diesen Gründen wurden 2009 einige Kriterien definiert und als Indikatoren für eine Chemotherapie festgelegt: HER2-Positivität, negativer Hormonrezeptorstatus bzw. unsichere endokrine Ansprechbarkeit, G3, Alter unter 35 Jahren, Lymphangiosis, lokal fortgeschrittenes Karzinom (pT3-4) sowie Lymphknotenmetastasen in vier oder mehr Lymphknoten [46].

Seit 2011 wird zusätzlich Ki-67 als Proliferationsmarker berücksichtigt, obwohl die Grenzwerte noch nicht ausreichend validiert sind. Es erfolgt nun anhand der Hormonrezeptoren, des HER2-Status und Ki-67 eine Einteilung in verschiedene molekulare Subtypen, der eine konkrete Handlungsanweisung folgt (Tab. 5) [46]. Da wir in unserem Kollektiv nicht auf Ki-67-Werte zurückgreifen können und die Unterteilung ansonsten keine Änderung in unserem Kollektiv bewirkt, findet Ki-67 keine weitere Berücksichtigung. Die Einteilung von 2007 eignet sich zwar nur bedingt zur Indikationsstellung einer Chemotherapie, aber sie ist immer gut geeignet das individuelle Rückfallrisiko abzuschätzen, so dass wir in unserer Arbeit auf diese Einteilung (unter dem Begriff aktuelle Risikoeinschätzung) zurückgreifen.

Molekularer Subtyp	Kriterien	Therapie
Luminal A	ER und/oder PR pos Ki-67 <14% HER2 neg G1	ET
Luminal B (HER2 negativ)	ER/ PR positiv Ki-67 >14% HER2 neg G1-2	ET, ggf. CHT
Luminal B (HER2 positiv)	ER/PR pos HER2 pos Ki-67 erhöht G1-2	ET, CHT, Anti-HER
Non-Luminal	HER2 pos ER/PR neg	CHT, Anti-HER
Triple negativ (Basalzelltyp)	ER/PR und HER2 neg	CHT
Weitere Kriterien	G3 <35 Jahre unsichere endokrine Ansprechbarkeit	CHT

Tabelle 5: Behandlungsempfehlungen nach molekularen Subtypen, (ET= endokrine Therapie, Anti-HER= Trastuzumab, CHT= Chemotherapie)

1.6 Human Epithelial Growth Factor Receptor 2 (HER2 oder ErbB)

HER2 ist das am häufigsten vorkommende Onkogen beim Mammakarzinom [115], [68]. Ein positiver HER2-Status liegt vor, wenn immunhistochemisch ein IHC-Score 3+, also die komplette und intensive Membrananfärbung von mehr als 10% der Tumorzellen vorliegt oder beim IHC-Score 2+ die anschließende ISH-Analyse positiv auf Genamplifikation ist (s. auch Tabellen 8 und 10) [125]. Die Überexpression des HER2-Rezeptors und/oder die HER2-Amplifikation sind mit einer schlechteren Prognose assoziiert [110], [91], [107]. Frauen mit HER2-positiver Erkrankung profitieren von der Therapie mit Trastuzumab (Herceptin®), einem humanisierten monoklonalen Antikörper. So konnte gezeigt werden, dass bei einer Therapie mit Trastuzumab das Risiko erneut an einem Mammakarzinom

zu erkranken, um etwa 50% reduziert wird [30], [70], [13]. Seit 2005 gehört die Bestimmung des HER2-Status (per IHC oder ISH-Analyse) zur Routineuntersuchung des Mammakarzinoms und hat als wesentlicher Bestandteil der Risikoeinschätzung große klinische Bedeutung erlangt [92].

Physiologische Bedeutung

Der HER2-Rezeptor ist ein 185 kDa großes Glykoprotein, bestehend aus 1255 Aminosäuren und kodiert auf dem Chromosom 17q [50]. Er gehört zu den ErbB-Proteinen. Diese bilden die Subgruppe I der Tyrosinkinase-Rezeptoren. Es gibt vier ErbB-Rezeptoren (ErbB1-4 bzw. HER 1-4) [2]. Namensgebend für die Gruppe ist der HER1-Rezeptor, der auch als **H**uman **E**pidermal Growth Factor (EGF)-**R**ezeptor bekannt ist. Alle HER-Rezeptoren weisen einen gemeinsamen molekularen Aufbau mit einer extrazellulären ligandenbindenden Domäne, einer transmembranösen Region und einer zytoplasmatischen Tyrosinkinase auf [111].

Durch Ligandenbindung wird die Dimerisierung der Rezeptoren initiiert. Dabei können sich die Dimere als Homodimere (zwei gleiche HER-Rezeptoren) oder als Heterodimere (2 unterschiedliche HER1-4 Rezeptoren) bilden. Die Dimerisierung führt über intrinsische Tyrosinkinaseaktivierung zur Autophosphorylierung der zytoplasmatischen Tyrosinreste. Die Tyrosinreste sind nun Bindungsstelle für Botenstoffe der intrazellulären Signalwege. Den aktivierenden Liganden ist gemein, dass sie alle eine EGF-ähnliche Aminosäuresequenz aufweisen [127]. Für HER1, 3 und 4 wurde verschiedene spezielle Liganden gefunden, beispielsweise EGF für HER1. Für HER2 dagegen konnte kein physiologischer Ligand ermittelt werden. HER2 fungiert als Ko-Rezeptor für die anderen HER-Rezeptoren. Dabei herrscht eine hohe Affinität der anderen HER-Rezeptoren zu HER2, so dass es gehäuft zur Dimerbildung mit HER2 kommt [119]. Die Signaltransduktion unter Dimerisierung mit HER2 ist verlängert und verstärkt. Dies ist zum einen auf die Heterodimerbildung im Allgemeinen zurückzuführen, die mit einer langsameren Lösung der Liganden einhergeht. Zum anderen wird das Heterodimer mit HER2 im Vergleich zu anderen Heterodimeren langsamer

internalisiert, so dass die Signaltransduktion später unterbrochen wird bzw. insgesamt verlängert ist [127], [78].

Daraus folgend, dass alle HER-Rezeptoren untereinander dimerisieren und eine Fülle an Kombinationen bilden können, wird durch diese Gruppe von Rezeptoren ein umfangreiches Signalnetzwerk geschaffen. HER-Rezeptoren finden sich sowohl in epitheliale, mesenchymale und neuronale Gewebe. Sie sind essentiell für Wachstum, Proliferation und morphologische Differenzierung [78]. Besondere klinische Relevanz hat in diesem Zusammenhang die Regeneration der Myozyten [36]. Über den HER2-Signalweg wird beispielsweise eine dilatative Kardiomyopathie verhindert (s. Abschnitt 1.3.1. Anthrazykline/ Nebenwirkungen) [76], [11].

Pathophysiologie

HER2 wird durch Amplifikation zum Onkogen. Die Amplifikation führt zur Überexpression von HER2-Rezeptoren an der Zelloberfläche. Das massenhafte Vorkommen der HER2-Rezeptoren in der Zellmembran (sichtbar gemacht durch die IHC) führt zur spontanen Dimerbildung ohne vorangehende Ligandenbindung. Das ausgedehnte Signalnetzwerk und die besondere Fähigkeit von HER2 die Signaltransduktion zu verlängern und zu potenzieren, erklären die erhöhten und anhaltenden Proliferationsraten bzw. die Neigung zum invasiven Wachstum und zur Metastasierung des HER2-positiven Mammakarzinoms [78].

Das HER2-positive Mammakarzinom geht nicht nur mit einem verbesserten Ansprechen auf Trastuzumab einher, sondern auch mit verlängertem Überleben nach anthrazyklinbasierter Therapie [107], [28], [46]. Jedoch konnte man auf molekularer Ebene keine Interaktion des Wachstumsrezeptors mit den Topoisomerase-Inhibitoren zeigen [77]. Das HER2-Onkogen ist ein Gen des 17q12-q21 Amplikon. Bei der näheren Betrachtung dieses Amplikons fand man unter anderem das Gen von Topoisomerase II α (TOP2A). Von allen koamplifizierten Genen des 17q12-q21 Amplikon ist das TOP2A-Gen deshalb interessant, da es das Zielmolekül der Anthrazykline verschlüsselt [58].

1.7 Topoisomerase II α

Physiologie

In eukaryotischen Zellen finden sich fünf verschiedene Formen der Topoisomerase: I, II α und β sowie III α und β . Sie sind Schlüsselenzyme der Zellteilung. Zellreplikation und DNA-Transkription sind ein Zusammenspiel aller Isoformen der Topoisomerase. Für die Kondensation und Segregation der Schwesterchromatiden ist die Topoisomerase II α essentiell. Bei Abwesenheit bzw. Hemmung der Topoisomerase II α kommt es nach Mitose zu polyploiden Zellen in der Interphase und damit zur Apoptose [55].

Die Topoisomerase II α generiert transiente Doppelstrangbrüche der superspiralisierten DNA-Helix. Dafür bindet das Enzym an Doppelstrang-DNA und unterbricht die Kontinuität der DNA-Helix. Über kovalenten Bindungen zwischen den 5'-Phosphorylenden des Doppelstrangbruchs und den Untereinheiten der Topoisomerase II α wird ein reversibler DNA-Proteinkomplex gebildet. In einem ATP-abhängigen Vorgang passiert nun ein intakter DNA-Doppelstrang durch diesen Bruch hindurch und entwindet damit die DNA-Helix. Nun kann der eigentliche Prozess der Transkription bzw. Translation ablaufen. Nach Abschluss der Transkription/Translation wird die Kontinuität der DNA-Helix durch Lösung des DNA-Proteinkomplex 'wiederhergestellt' [82].

Pathophysiologie

Die TOP2A-Amplifikation wird bei 7-12% aller Mammakarzinome beschrieben [57]. Je nach Studie wird bei 37,5% bis 90% der Fälle von Koamplifikationen mit HER2 berichtet [59],[63], [85], [5], [80], [22], [120]. Nur wenige Autoren beschreiben eine alleinige TOP2A-Amplifikation bei bis zu 38% der HER2-negativen Tumorproben [5], [15], [105].

Die Amplifikation des TOP2A-Gens bzw. die Überexpression von Topoisomerase II α resultiert möglicherweise in einem besseren Ansprechen der Anthrazykline und könnte bei koexistenter HER2-Amplifikation das verbesserte Überleben

HER2-positiver Patientinnen unter anthrazyklinbasierter Therapie erklären [49], [124], [20].

1.8 Untersuchungsmethoden von HER2 und TOP2A

Es gibt im Wesentlichen zwei etablierte Nachweismethoden für die Bestimmung des HER2- und TOP2A-Status: die In situ Hybridisierung (ISH) und die immunhistochemische Untersuchung (IHC).

ISH-Analyse

Die ISH-Analyse erfolgt auf Genniveau: Man unterscheidet die Chromogene- (CISH) und die Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH). Sie erfolgt auf DNA-Niveau durch Markierung des Zielgenes (HER2 oder TOP2A) entweder mit einem Fluoreszenzfarbstoff (FISH) oder einem Chromogen (CISH). Anschließend wird das Präparat entweder im Fluoreszenzmikroskop oder unter dem Lichtmikroskop ausgewertet. Die mit Farbstoff markierten Genabschnitte sind unter dem Mikroskop als Farbpunkte erkennbar. Im Falle der FISH-Analyse werden die Gene durch verschiedene Farbfilter sichtbar gemacht: das HER2-Gen ist grün, das TOP2A-Gen rot und der Referenzabschnitt, das Centromer des Chromosom 17, blau. Die Anzahl der Gene pro Centromer wird bestimmt, indem man die roten bzw. grünen Punkte gegen die blauen Punkte in mindestens 60 Zellen ausgezählt. Eine Ratio wird vorher festgelegt, ab wann man von Amplifikation bzw. Deletion spricht. Wohingegen die Ratio für HER2 durch die ASCO-Guidelines festgelegt ist, unterscheiden sich die Quotienten bei TOP2A in den verschiedenen Studiengruppen zum Teil erheblich [125]. Als Genaberration wird sowohl die Deletion, das Fehlen des Genes (je nach Studiengruppe: Ratio $<0,9-0,4$), als auch die Amplifikation (je nach Studiengruppe: Ratio $>1,5-2,2$), das vielfache Vorkommen eines Genes, bezeichnet. Die FISH-Analyse ist sowohl weitgehend unabhängig von der Qualität der Gewebefixierung als auch hochreproduzierbar zwischen verschiedenen Laboratorien. Jedoch ist diese Methode kosten- und zeitaufwändiger. Desweiteren muss die Veränderung auf

DNA-Ebene nicht zwangsläufig in veränderten Proteinmengen resultieren, da vom Gen zum Genprodukt verschiedene Faktoren regulierend eingreifen [98]. Eine entsprechende Korrelation konnte nur für die HER2-Amplifikation und die Überexpression gezeigt werden [102]. Für die TOP2A-Genalterationen und Topoisomerase II α -Proteinlevel ist dies unsicher [65], [57].

Immunhistochemische Untersuchung (IHC)

Eine alternative Methode ist die immunhistochemische Untersuchung (IHC). Mittels IHC wird das Enzym Topoisomerase II α bzw. der HER2- Rezeptor durch Bindung von farbstoffmarkierten Antikörpern visualisiert. Es erfolgt eine semiquantitative Auswertung in Form einer Schätzung, wie hoch der Anteil an angefärbten Zellen und wie ausgeprägt die Intensität des Anfärbemusters ist. Das Ergebnis erlaubt keine Aussage über die Aktivität des Proteins. Die Auswertung ist stark von der Erfahrung des Untersuchers abhängig und auf Grund der Art der Auswertung ungenau und schlecht reproduzierbar. Die routinemäßige Anwendung erfordert daher Qualitätssicherungsmaßnahmen wie interne Testvalidierung durch Vergleich von IHC und (F)ISH, interne Kontrollen sowie jährliche Teilnahme an Ringversuchen. Die IHC ist gegenüber der FISH-Analyse die kostengünstigere Methode [98], [125].

1.9 Arbeitshypothese und Fragestellung

Brustkrebs ist die häufigste Tumorerkrankung der Frau. Die Patientinnen sind heterogen bezüglich klinischer Voraussetzungen und der jeweiligen Tumorbiologie. Angesichts der Tatsache, dass das Langzeitüberleben der Frauen in den letzten Jahren deutlich gesteigert werden konnte, ist es unerlässlich, die Langzeitfolgen der Therapien gegen den zu erwartenden Benefit abzuwägen. Hierzu dienen unter anderem die prognostischen und prädiktiven Marker. Unter den etablierten Markern finden sich der Hormon- und HER2-Status, die Informationen über den zu erwartenden Erfolg einer endokrinen bzw. anti-HER2-Therapie geben. Für die adjuvante anthrazyklinbasierte Chemotherapie fehlen solche prädiktiven Marker. Insbesondere die Anthrazykline gehen mit schwerwiegenden Langzeitschäden, wie der Anthrazyklin assoziierten AML

sowie der Chemotherapie assoziierten Kardiotoxizität (CRCD I), einher. Bei HER2-positiver Erkrankung ist heutzutage die anti-HER2-Therapie mit Trastuzumab obligat. Auch diese Therapie geht mit dem Risiko einer kardialen Schädigung einher. Die Kombination von Trastuzumab und Anthrazyklinen erhöht das Risiko einer klinisch relevanten Herzmuskelschädigung. Als Angriffspunkt der Anthrazykline könnte die Topoisomerase II α als ein solcher Prädiktor geeignet sein. Darüber hinaus scheint die Amplifikation von TOP2A mit der HER2-Amplifikation assoziiert zu sein und definiert möglicherweise eine Subgruppe der HER2-positiven Tumore, die besonders gut auf Anthrazykline ansprechen.

In unserer Studie sollte untersucht werden, ob die TOP2A-Amplifikation als Prädiktor für eine anthrazyklinbasierte Therapie geeignet ist.

Um den Einfluss auf das Überleben nach Trastuzumab zu minimieren, wurde ein Patientenkollektiv vor der Markteinführung von Trastuzumab ausgewählt. In unsere retrospektive Studie schlossen wir insgesamt 128 an Brustkrebs erkrankte Frauen ein, die alle in den Jahren 2003 und 2004 in den Städtischen Kliniken Offenbach/Main (später Sana Klinikum Offenbach) operiert worden waren. Staging-Parameter wurden den Patientenakten entnommen. Der klinische Verlauf wurde mittels Fragebögen und Telefoninterviews von den weiterbehandelnden Fachärzten und den Patientinnen erfasst. Anhand von Schnittmaterial archivierter Paraffinblöcke der Tumorproben wurde ein histopathologisches Tumorgrading im Institut für Pathologie in Offenbach/Main durchgeführt und im Institut für Pathologie des Krankenhauses Darmstadt einer FISH-Analyse unterzogen. In Zusammenarbeit mit dem Institut für Biostatistik und mathematischer Modellierung der Johann-Wolfgang-Goethe-Universität in Frankfurt/Main führten wir die statistische Analyse durch.

Folgende Fragen sollten gezielt untersucht werden:

1. Wie hoch ist die Prävalenz der TOP2A- und HER2-Amplifikation in einem Normalkollektiv? Wie verhalten sich die Genaberrationen zueinander?
2. Haben die beiden o.g. Genaberrationen einen prognostischen Wert? Wie sind die Prognosefaktoren in Abhängigkeit der Genaberrationen verteilt und beeinflussen sie das Rezidivrisiko? Wie verhalten sich die Überlebenszeiten in Abhängigkeit der Genmarker?
3. Weisen die beiden Genaberrationen einen prädiktiven Wert für die anthrazyklinbasierte Therapie auf? Gibt es einen Zusammenhang des rezidivfreien Überlebens (DFS/Disease Free Survival) und Überlebens (OS/ Overall Survival) in Abhängigkeit der anthrazyklinbasierten Therapie und der Genaberrationen?

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Materialien für die histologische Aufarbeitung und Fish-Analyse

Geräte und Verbrauchsmaterialien

Automat zur Vorbehandlung „VP 2000“	Abbott
Deckgläser Nr.1 12 x12mm	Marienfeld GmbH
Einmal-Pasteurpipetten 3ml	
Farbfilter: grün, azur, gold, rot-grün	
Fluoreszenzmikroskop „Axioskop“	Zeiss
Glaswaren	Schott
Hybridisierungsautomat „Hybrite“	Abbott
Kamera „Leica DFC 300FX/ ebq 1000 isolated“	Leica
Laborwaage „AC211S“	Sartorius
Mikrotom „HM400“	Mikrom
Mikrowelle	Bosch
Objektiv „Objective Zeiss neofluoar“ 100HP	Zeiss
Objektträger Superfrost® Plus, Thermo Scientific	Menzel
pH-Meter „pH523“	WTW
Pinzette	
Pipetten 0,5-10µl	Eppendorf
Pipettenspitzen „Aerojet tips“ 10µl	Ratiolab
Trockenschrank	Heraus
Vortexer „Reamix Assistent 2789“X	Karl Hecht
Wasserbad	Memmert
Zentrifuge „Biofuge fresco“	Heraeus

Gebrauchsfertige Chemikalien

DAPI-II-Counterstain (4'6 diamidino-2-phenylindole 2HCl)	Abbott
Destilliertes Wasser „Ampuwa Spüllösung“	Fresenius
Destilliertes Wasser „Ultra Pure Water sterile“	Seromed Biochrom
Eisessig	Roth
Ethanol, 100%	Applichem
Ethanol, 96%	Applichem
Fluoreszenzfreies Immersionsöl	Applichem
Formaldehyd 37%	
Formalin	Hauseigen
Kleber Fixogum	Marabu
Locus Specific Identifier(LSI)PathVysion	
HER2 TOP2A CEP 17 Sonde	Abbott
Magnesiumchlorid, 2M	Abbott
Methanol	Merck
Natriumcitratdihydrat, 0,1M	Merck
Natronlauge	
NP40 (NonidetP40, Octyphenolpolyethylenglycolether)	Abbott
PBS-Puffertabletten (Phosphat Buffered Saline, pH 7,2)	Merck
Pepsin	Sigma
Pretreatmentreagenz	Abbott
Proteasepuffer	Abbott
Proteasepulver	Abbott
Saline Sodium Citrate Buffer, 20x SSC	Abbott
Salzsäure, 0,2 N	Merck
Salzsäure, 2M	Merck

Xylol, reinst	Pathomed
	Logistik
Zitronensäure, 0,1M	Merck

Lösungen

Carnoysche Lösung

Zu Methanol wird langsam Eisessig gegeben, im Verhältnis 3:1

20xSSC-Lösung

20xSSC	132g
Aq.dest.	500ml
mit HCl bzw. NaOH auf pH 5,3 einstellen	

2xSSC-Lösung

20xSSC	100ml
Aq.dest.	900ml
mit HCl bzw. NaOH auf pH 7,2 einstellen	

Proteaselösung

Proteaspulver	400mg
Proteaspuffer	500ml

2xSSC/0,3%NP40-Reagenz

20xSSC	100ml
Aq.dest	900ml
NP-40	3ml
auf pH 7,2 einstellen	

Zitratpuffer Gebrauchslösung

0,1M Zitronensäure	17ml
0,1M Natriumcitratdihydrat	83ml
Aq.dest.	ad 1000ml

Pepsin Gebrauchslösung

Stammlösung

Pepsin	250mg
Aq.dest.	50ml

Gebrauchslösung

Pepsinstammlösung	1ml
2M HCl	0,5ml
Aq.dest.	ad 100ml

PBS-Puffer

PBS-Puffertablette	1 Tablette
Aq.dest.	1000ml

0,05% Formalin Gebrauchslösung

1% Formalin Stammlösung

37% Formaldehyd	2,7ml
2M MgCl	2,5ml
PBS-Puffer	94,8ml

0,05% Formalin Gebrauchslösung

1%Formalin Stammlösung	5,4ml
PBS-Puffer	94,6ml

2.2 Patientenkollektiv

Die Patientinnen des Studienkollektivs wurden in den Jahren 2003 und 2004 in der Frauenklinik des Klinikum Offenbach/Main GmbH wegen eines Mammakarzinoms operiert. Einschlusskriterium war der histopathologische Nachweis eines invasiven Mammakarzinoms. Von insgesamt 250 Patientinnen mussten 29 aufgrund unzureichender Dokumentation ausgeschlossen werden. Nach Sichtung der archivierten Tumorblöcke bzw. der entsprechenden Objektträger sowie Graduierung der Tumordifferenzierung (im Folgenden als Grading bezeichnet) wurden weitere 78 Patientinnen aus nachstehenden Gründen von der Analyse ausgeschlossen (s. Abbildung 1):

- zu geringe Tumorlast (n=3) (z.B. bei Mikroinvasion, Lymphangiose oder Nachsektion einer außerhalb des Klinikum Offenbach/Main voroperierten Brust).
- zu kleine Tumoren (n=42), deren Gewebe für die Diagnostik aufgebraucht worden war.
- Tumorgewebe nur in den Schnellschnittblöcken (n=30). Dieses Material ist wegen vermehrt falsch negativer Ergebnisse grundsätzlich nicht für eine FISH-Analyse geeignet.
- kein Tumor mehr nachweisbar (n=3), (Gewebe aus den Paraffinblöcken herausgebrochen oder in den tieferen Schnittstufen tumorfrei).

Für die FISH-Analyse konnten die Gewebeproben von 143 Patientinnen verwendet werden.

Von der weiteren statistischen Auswertung wurden fünf weitere Datensätze ausgeschlossen (männliches Geschlecht, Rezidivoperation). Bei zehn Patientinnen konnte unmittelbar nach der Entlassung der weitere klinische Verlauf nicht verfolgt werden, da sie unter der bekannten Adresse oder bei den

niedergelassenen Kollegen nicht mehr auffindbar waren (lost to follow-up). Für die statistische Auswertung konnten letztlich Daten von 128 Frauen verwendet werden. Von diesen lag bei 8 ein primär metastasiertes Mammakarzinom vor.

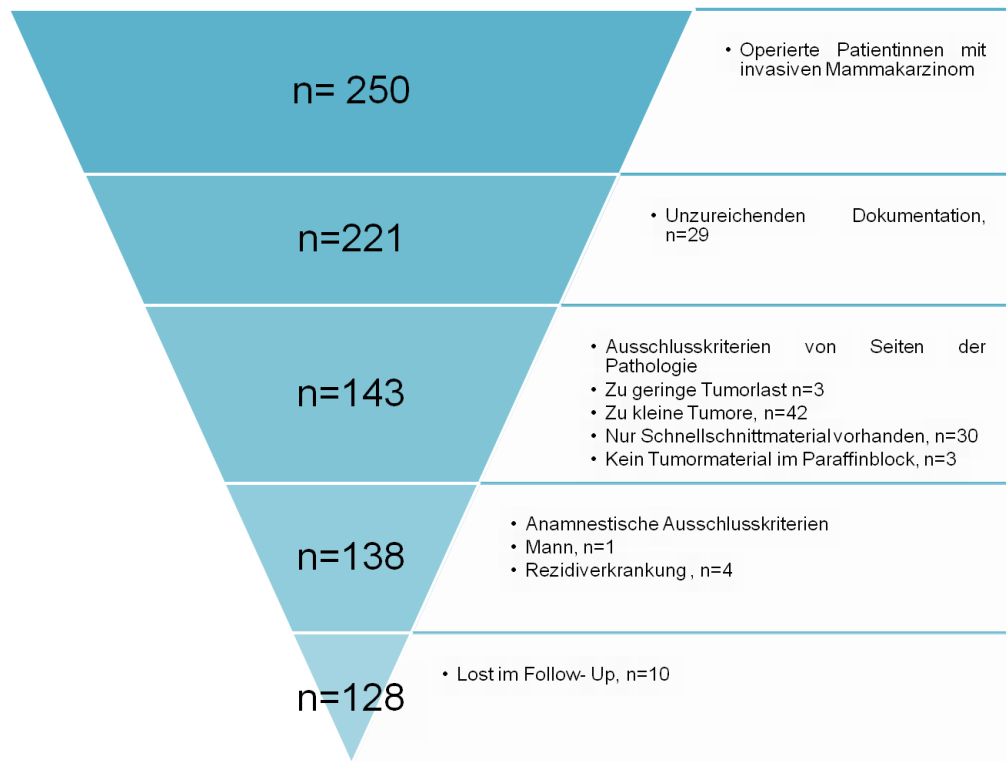


Abbildung 1 Patientenkollektiv

2.3 Pathomorphologische Untersuchung

2.3.1 Histologisches Typing und Grading

Bei allen Tumorproben erfolgte eine histopathologische Typisierung entsprechend der WHO-Kriterien [123].

Invasiv duktales Mammakarzinom

Das Grading der invasiv duktales Mammakarzinome erfolgte anhand des modifizierten Score nach Elston und Ellis [32], [31]. Die dreistufige Beurteilung berücksichtigt das Ausmaß des tubulären Tumorstromas, die Ausprägung der Kernpolymorphie und die Mitoserate pro 10 HPF (High Power Fields/

Bildausschnitte in der höchsten Vergrößerung). Jeder Parameter wurde mit Punkten bewertet. Die Summe der Einzelbewertungen führte zum Grading score (Tab. 6).

Merkmal	Ausprägung	Punktzahl
Tubulusausbildung	>75%	1
	10-75%	2
	<10%	3
Kernpolymorphie	Gering	1
	Mäßig	2
	Stark	3
Mitoserate/ 10 HPF	0-5	1
	6-11	2
	≥12	3
Score 3-5: G1- hoch differenziert		
Score 6-7: G2- mäßig differenziert		
Score 8-9: G3- gering differenziert		

Tabelle 6 Histopathologisches Grading des invasiv dukalen Mammakarzinom

Invasiv lobuläres Mammakarzinom

Das histopathologischen Grading der invasiv lobulären Mammakarzinome berücksichtigt die Morphologie und die Mitosezahl. Wie beim Grading des invasiv dukalen Mammakarzinoms ergibt die Bewertung einen Summenscore, dem jeweils ein Differenzierungsgrad zugeordnet ist (Tab. 7).

	1 Punkt	2 Punkte	3 Punkte
Variante	Tubulo-lobulär alveolär	Klassisch siegelringzellig pleomorph	Solide
Mitosen/ 10HPF	0-3	4-10	>10
2 Punkte: G1- gut differenziert 3-5 Punkte: G2- mäßig differenziert 6 Punkte: G3- gering differenziert			

Tabelle 7 Histopathologisches Grading des invasiv lobulären Mammakarzinom

Sonderformen

Bei speziellen Tumorentitäten, wie z.B. dem muzinösen (Tumorzellnester in extrazellulären Schleimseen), dem medullären (synzytiales Wachstumsmuster bei Abwesenheit glandulärer Strukturen in Kombination mit Lymphozyteninfiltrate und scharfer peripherer Begrenzung) oder dem tubulären Mammakarzinom erfolgte das histopathologische Grading nach Elston und Ellis [31], [32].

2.4 Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH-Analyse)

Gewebe Gewinnung, -fixierung und -vorbereitung

Das Tumorgewebe war nach der operativen Entnahme makroskopisch begutachtet, zugeschnitten und nach dem gängigen Verfahren in Paraffin eingebettet worden. Von den Paraffinblöcken der Gewebeproben wurden mit einem Mikrotom ca. 4µm dünne Schnitte angefertigt, in einem warmen Wasserbad (ca. 50°C) auf adhäsiv beschichtete Objektträger aufgezogen. Von jeder Tumorprobe wurde zusätzlich je eine Hämatoxylin-Eosin-Färbung (H.E) angefertigt, um das geeignete Tumorareal mit einem Filzstift zu markieren. Leer- und H.E.-Schnitt wurden dann deckungsgleich übereinander gelegt und das zu

untersuchende Gebiet mit einem Diamantschreiber auf der Rückseite des Leerschnittes eingraviert.

2.4.1 Konventionelles Verfahren

Entparaffinierung

Um das Paraffin zu erweichen wurden die Tumorproben zunächst für ca. eine halbe Stunde bei 67° C im Trockenschrank erwärmt. Anschließend wurde das Formalin mit Xylol herausgewaschen (zweimal zehn Minuten) und in einer absteigenden Alkoholreihe von Xylol gereinigt und das Gewebe dehydriert (zweimal zehn Minuten in 100%-igem Alkohol und zweimal fünf Minuten in 96%-igem Alkohol). Nachfolgend wurden die Proben in gekühlter Carnoyscher Lösung über gut dreißig Minuten fixiert und verblieben dann für zwei Minuten in Aq.dest.

Vorbehandlung (Pretreatment)

Die noch nassen Objektträger wurden zügig in den Vorbehandlungsautomaten geladen und für 20 Minuten in 0,2N HCl denaturiert. Daraufhin wurden sie für drei Minuten mit Aq.dest. und anschließend drei Minuten 2xSSC gewaschen. Zur weiteren Denaturierung wurden die Schnitte 15 Minuten lang bei 80°C in der Pretreatmentlösung gekocht, dann erneut in 2xSSC gespült (zweimal fünf Minuten). Die anschließende Denaturierung erfolgte für 80 Minuten bei 37°C in der Proteaselösung. Nach einem erneuten Waschgang (zweimal fünf Minuten in 2xSSC) wurden die Proben schließlich für zehn Minuten in 4%iges Formalin getaucht. Vor der abschließenden Trocknung (zwei Minuten bei 45- 50°C) wurde erneut für zweimal fünf Minuten in 2xSSC gewaschen.

Hybridisierung

Die Sonde war bis zur Analyse bei minus 20°C gelagert worden. Für die Untersuchung wurde sie dann im Dunklen auf Raumtemperatur gebracht, gevortext und kurz bis 13000 Umdrehungen/min zentrifugiert. 10µl der Sonde

wurden zügig auf die markierten Areale pipettiert, mit einem Deckglas versehen, großzügig mit Kleber umrandet und in den Hybridisierungsautomaten geladen. In diesem erfolgte zunächst eine fünfminütige Inkubation bei 73°C, der sich die Bebrütung bei 37°C für die nächsten 18 Stunden anschloss.

Gegenfärbung

Nach der Entnahme aus dem Hybridisierungsautomaten wurde der nun getrocknete Kleber vorsichtig abgerubbelt und die Deckgläser mit einer Pinzette unter Schonung des Gewebes abgeschoben. Das Waschen der Objektträger erfolgte in dem 2xSSC/0,3%NP40-Reagenz für zweimal zwei Minuten. Die verwendeten Gefäße standen hierfür in einem ca. 73°C heißen Wasserbad. Um Schlieren zu vermeiden, wurden die Objektträger vor der Trocknung noch einmal durch lauwarmes 2xSSC/0,3%NP40-Reagenz gezogen. Danach wurden die Schnitte im Dunkeln bei Raumtemperatur getrocknet. Das DAPI-II-Counterstain musste ebenfalls vor der Verwendung auf Raumtemperatur gebracht werden. 10µl der zähflüssigen Kontrastfärbung wurden nach der Trocknung zügig auf die Objektträger pipettiert und wieder mit einem Deckglas versehen. Die Präparate konnten sofort mit dem Mikroskop untersucht werden. Bis zur tatsächlichen mikroskopischen Untersuchung wurden sie im Kühlschrank bei ca. 5°C gelagert.

2.4.2 Verfahren nach Hannover

Bei 20 Proben konnte die vorangegangene FISH-Analyse nicht ausgewertet werden. Es wurde die Hannover-Methode verwendet. Die oben beschriebenen Schritte der Entparaffinierung, der Hybridisierung und der Gegenfärbung waren identisch. Lediglich in der Vorbehandlung unterschieden sich die beiden Verfahren.

Vorbehandlung (Pretreatment)

Zunächst wurden die Schnitte für fünf Minuten in 200ml Zitratpuffer Gebrauchslösung bei 900Watt in der Mikrowelle gekocht. Danach wurde das verdunstete Volumen mit Aq.dest. aufgefüllt und die Proben erneut für fünf

Minuten bei 600Watt konditioniert. Dann folgte ein Waschgang von einer Minute in 200ml Aq.dest. Anschließend wurden die Gewebeproben für fünf Minuten in der Pepsin Gebrauchslösung denaturiert. Nachfolgend wurde für eine Minute in Aq.dest. gewaschen. Schließlich wurden die Proben für zehn Minuten in 0,05% Formalin Gebrauchslösung fixiert. Ein letzter Waschgang in Aq.dest. ging der zehnminütigen Trocknung im Brutschrank bei 37-40°C voran. Es folgten die Hybridisierung und die Gegenfärbung wie oben beschrieben.

2.5 Mikroskopische Auswertung

Auswertschema

Die geeigneten Stellen eines Präparates wurden jeweils mit den Farbfiltern azur und rot-grün, gegebenenfalls mit gold und grün fotografiert. Es wurden die Signale von mindestens 60 Zellen gegeneinander ausgezählt und das Verhältnis der HER2- bzw. TOP2A-Signale zu den CEP17-Signalen errechnet. Amplifiziert galt eine Gewebeprobe, wenn das Verhältnis HER2- bzw. TOP2A zu CEP17 größer gleich 2,2 betrug. Unter einer Ratio von 1,8 lag keine Amplifikation vor. Bei einer Ratio zwischen 1,8 und 2,2 mussten 60 weitere Zellen ausgezählt werden. Polyploid wurde jedes Gewebe bezeichnet, das in der überwiegenden Mehrheit der Zellen mehr als vier blaue Signale aufwies.

TOP2A bzw. HER2neu/ CEP17	Ergebnis
>5,0	Hohe Amplifikation
>2,2	Amplifikation
>1,8-2,2	Grenzfall, weitere 60 Zellen auszählen
<1,8	Keine Amplifikation
<0,8	Deletion

Tabelle 8 Auswertschema

2.6 Klinische Datenerhebung

Anhand der Klinikakten und in Zusammenarbeit mit den niedergelassenen Ärzten wurden folgende Parameter erhoben: Geschlecht, Alter bei Erstdiagnose, Familienanamnese, Multimorbidität, Operationsmodus, TNM-Klassifikation, Hormon- und HER2-Rezeptorstatus, erhaltende Chemotherapieregime, Radiotherapie, antihormonelle Therapie sowie der klinische Verlauf vom Zeitpunkt der Operation bis 12/2009. Der Menopausenstatus wurde anhand der Angabe in den Akten erhoben. Dabei war die Angabe der letzten Regelblutung ausschlaggebend. Bei Fehlen dieser Angabe wurden ab einem Alter von 50 Jahren die Patienten als postmenopausal eingestuft.

Außerdem wurde eine Risikoeinstufung nach den Empfehlungen der Konsensuskonferenzen von St. Gallen 2003 und 2007 vorgenommen. Da die Risikoeinstufung von 2007 weiterhin besteht, wird sie im Folgenden auch als aktuelle Risikoeinstufung bezeichnet. Die unterschiedlichen Klassifikationen sind den Tabellen 3-5 in Kapitel 1.4 zu entnehmen.

% positiver Zellkerne (PP)		Färbeintensität (FI)		Score PPxFI= IRS
0%	0 Punkte	Keine	0 Punkte	IRS 0: negativ
<10%	1 Punkt	Schwach	1 Punkt	IRS 1: unsicher
10-50%	2 Punkte	Mäßig	2 Punkte	IRS≥2: positiv
51-80%	3 Punkte	Stark	3 Punkte	
>80%	4 Punkte			

Tabelle 9: IRS-Score nach Remmele W et al. 1987 [94].

Der Rezeptorstatus war zum damaligen Zeitpunkt auswärts in den Horst-Schmidt-Kliniken in Wiesbaden bestimmt worden. Zur Evaluierung des Östrogen- bzw. des Progesteronrezeptorstatus war der immunreaktive Score (IRS) nach Remmele et al., für den HER2-Status der Herceptest™ (DAKO) angewendet worden (Tab. 9 und 10).

Anfärbungsmuster	Score (Scoring)	HER2-Protein Überexpression Bewertung
Es kommt zu keiner Färbung bzw. zu einer inkompletten und kaum wahrnehmbaren Membranfärbung bei weniger als 10 % der Tumorzellen.	0	Negativ
Bei mehr als 10 % der Tumorzellen tritt eine schwache bzw. kaum wahrnehmbare Membranfärbung auf. Es kommt nur zu einer teilweisen Färbung der Zellmembran.	1+	Negativ
Bei mehr als 10 % der Tumorzellen tritt eine schwache bis mäßige, aber vollständige Membranfärbung auf.	2+	Schwach positiv
Bei mehr als 10 % der Tumorzellen tritt eine vollständige und starke Membranfärbung auf.	3+	Stark positiv

Tabelle 10: Kriterien für die Bestimmung des HER2-Status durch IHC, Herceptest™(DAKO) Kriterien für die Intensität der Anfärbung der Zellmembran [34], [125].

2.7 Statistische Methoden

Um das Überleben mit den Genaberrationen zu korrelieren, wurden drei Kollektive gebildet:

- Das Kontroll-Kollektiv umfasste alle Karzinome ohne TOP2A- oder HER2-Amplifikation.
- Das HER2-Kollektiv bildete sich aus ausschließlich HER2-amplifizierten Tumoren.
- Das Koamplifikation-Kollektiv umfasste alle Karzinome mit TOP2A- und HER2-Amplifikation.

Zur statistischen Auswertung wurde das Programm BiAS. für Windows, copyright Epsilon-Verlag 1989-2008 verwendet. Folgende statistische Methoden wurden verwendet: deskriptive Analyse, χ^2 - Test, Fischer's exakter Test, Logrank-

Test, Kaplan Meier Test, Hazard Raten mit Konfidenzintervall, Cox Regression und Biovariate Analyse.

3 ERGEBNISSE

3.1 Patientenkollektiv

3.1.1 Zahl

Das untersuchte Patientenkollektiv bestand aus 128 Frauen, die alle im Rahmen ihrer Brustkrebserkrankung in den Städtischen Kliniken Offenbach/Main zwischen dem 01.01.2003 und 31.12.2004 operiert worden waren.

3.1.2 Charakteristika

Alter

Das Alter bei Erstdiagnose variierte vom 35. bis 98. Lebensjahr. Der Median lag bei 63 Jahren (Abb.2).

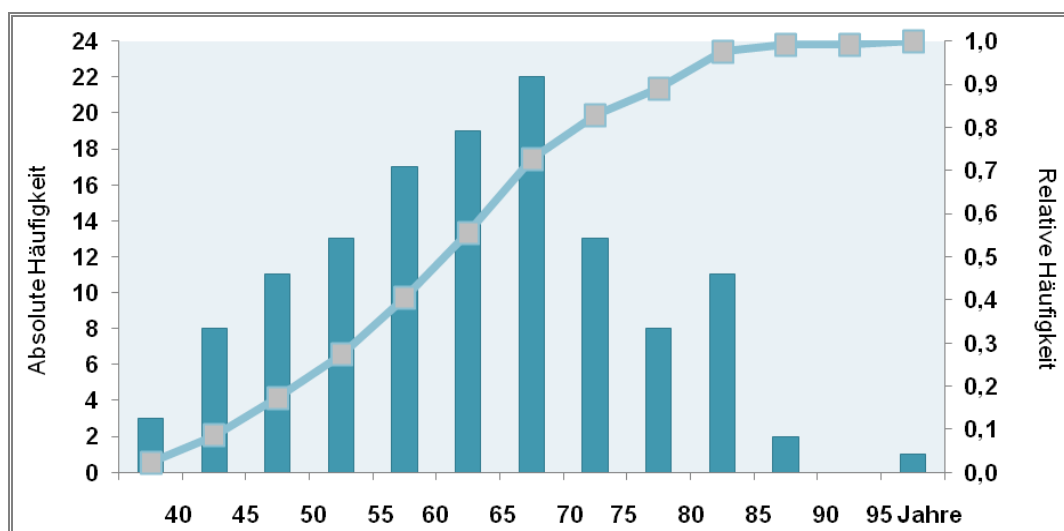


Abb. 2 Alter bei Diagnosestellung.

Menopausenstatus

Bei 27 Frauen (19,01%) wurde die Diagnose vor der Menopause gestellt (prämenopausal). Dagegen erkrankten 114 (80,83%) Frauen peri- oder postmenopausal.

		Kontrollgruppe	HER2- Amplifikation	Koamplifikation
Anzahl	n= 128	108 (84,37%)	13 (10,16%)	7 (4,47%)
Alter bei Erstdiagnose	Min	37	35	46
	Max	98	82	83
	Median	63	63	69
Menopausen status	Prä	19 (17,53%)	4 (30,77%)	1 (14, 29%)
	Post	89 (82,47%)	9 (69,23%)	6 (85, 71%)

Tabelle 11: Allgemeine Charakteristika der drei Patientengruppen

3.1.3 Therapien

Operative Therapie

Eine brusterhaltende Therapie wurde bei 66 (51,56%), eine primäre radikale Mastektomie bei 56 (43,75%) und eine sekundäre Mastektomie bei 6 Frauen (4,69%) durchgeführt. Bei allen Patientinnen wurde beim invasiven Karzinom eine axilläre Dissektion im Level I + II durchgeführt. Eine Sentinel-Lymphknoten Detektion erfolgte im Untersuchungszeitraum nur in Einzelfällen.

Bestrahlung (Radiatio)

Eine adjuvante Radiatio wurde bei 102 Patientinnen (79,69%) indiziert. Trotz brusterhaltender Therapie wurden fünf Patientinnen nicht bestrahlt, weil entweder

Kontraindikationen für die Radiatio bestanden oder diese Therapie von der Patientin abgelehnt wurde.

Adjuvante endokrine Therapie

Als adjuvante endokrine Therapie wurde bei 95 Patientinnen (94,06%) Tamoxifen und bei 13 Patientinnen (12,87%) ein Aromataseinhibitor verwendet. Bei vier Frauen (30,77%) wurde eine sog. sequentielle Hormontherapie (zunächst Tamoxifen, dann Umstieg auf einen Aromataseinhibitor) durchgeführt. Ein GnRH-Analogon wurde bei 13 Patientinnen (12,87%) verabreicht, von denen 10 Frauen (76,92%) zusätzlich eine Tamoxifen-Therapie erhielten.

Adjuvante Chemotherapie

Insgesamt 70 Patientinnen (54,69%) erhielten mindestens ein Chemotherapieregime. Eine anthrazyklinbasierte Chemotherapie wurde bei 61 Frauen (87,14%) ausgewählt, von denen sieben Frauen (10,0%) zusätzlich ein Taxan bekamen. Ein metotrexathaltiges Chemotherapieregime erhielten zwei Patientinnen (2,86%). Wegen Kontraindikationen wurde bei sechs Patientinnen (4,69%) auf eine Chemotherapie verzichtet. Darüber hinaus lehnten drei Frauen (2,34%) eine Zytostatika-Behandlung ab. Tabelle 12 gibt einen Überblick über die verwendeten Regime.

	Gesamt		Kontrolle		HER2-Amplifikation		Koamplifikation	
	n=128		n=108		n=13		n=7	
EC/FEC	n=61	(47,66%)	53	(49,07%)	6	(46,15%)	2	(28,57%)
CMF	n=2	(1,56%)	2	(1,85%)	0		0	
TAC	n=7	(5,47%)	4	(3,70%)	1	(7,69%)	2	(28,57%)
keine	n=58	(45,31%)	49	(45,37%)	6	(46,15%)	3	(42,86%)

Tabelle 12: Erhaltene Therapien in den drei Patientengruppen.

3.1.4 Tumorhistologie

Histopathologisches Typing

Es lagen 109 Karzinome (85,16%) vom invasiv duktalem Typ vor. In 15 Fällen fand sich ein invasiv lobuläres Karzinom (11,72%). Unter den übrigen waren zwei muzinöse (1,56%), ein papilläres sowie ein medulläres Karzinom (je 0,78%).

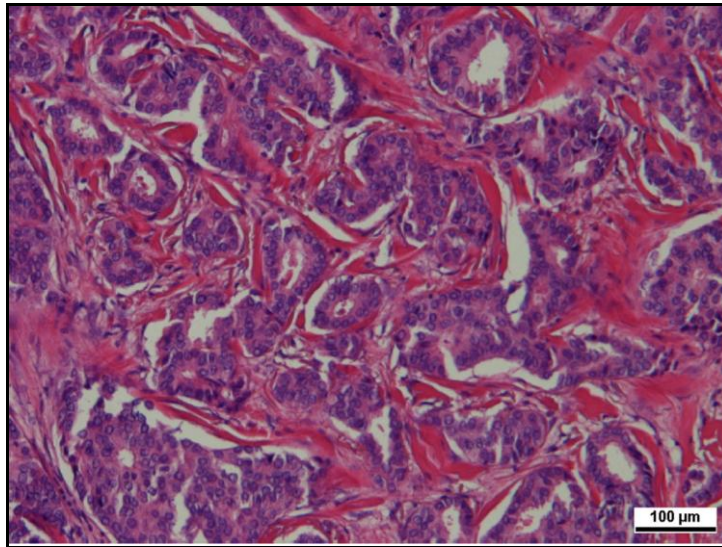


Abb. 3: Invasiv duktales Mammakarzinom mit Tubulusbildung (H.E.-Färbung, Vergrößerung)

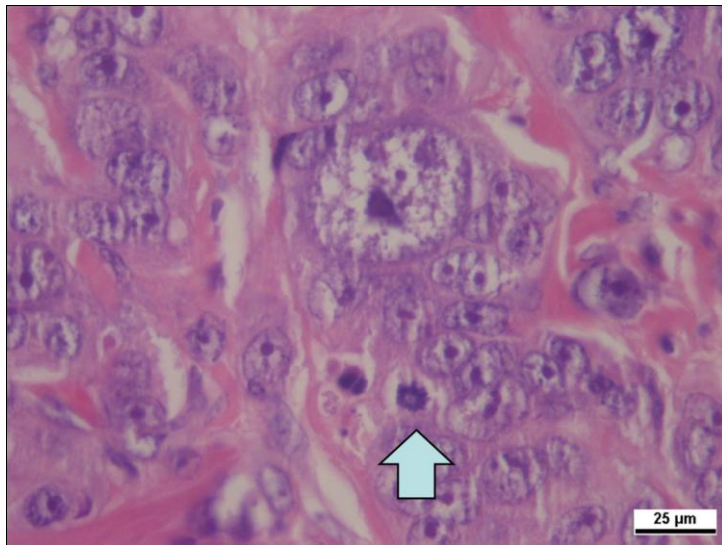


Abb. 4: Beispiel für ausgeprägte Kernpleomorphie und Mitosefigur/Pfeil. (H.E.-Färbung, HPF 400fache Vergrößerung)

Histopathologisches Grading

Bei 12 Tumorproben (9,38%) war das Karzinom gut, bei 51 Tumorproben (39,84%) mäßig und bei 65 Proben (50,78%) niedrig differenziert.

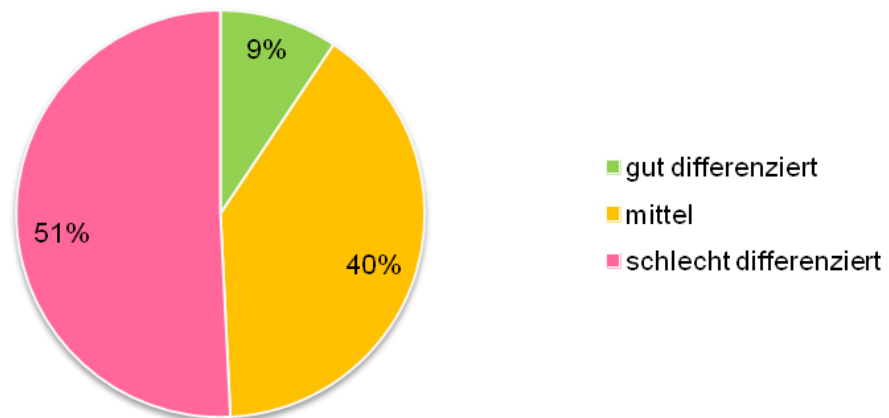


Abb. 5: Prozentuale Verteilung des histopathologischen Grading

TNM-Klassifikation

Karzinome mit einem Durchmesser von weniger als zwei Zentimeter (T1) wurden bei 61 Patientinnen (47,66%) nachgewiesen. Es wurden 44 Karzinome (34,38%) mit einem Durchmesser zwischen 2cm und 5cm festgestellt (T2). Bei vier Frauen (3,13%) war der Tumor größer als fünf Zentimeter (T3). In 19 Fällen (14,84%) lag eine Tumorausdehnung gemäß pT4 vor.

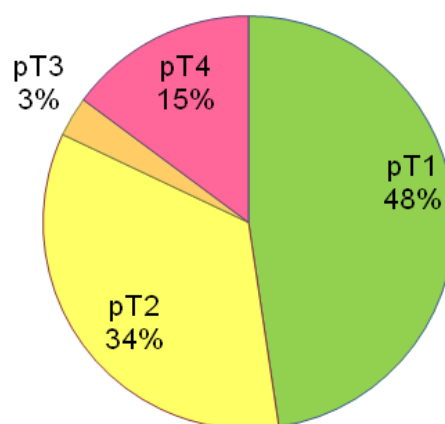


Abb. 6: Prozentuale Verteilung der T-Stadien

Nodal-negativ waren 63 Patientinnen (49,12%), und 65 Frauen (50,78%) hatten einen positiven Nodalstatus. Bei 33 Frauen (25,78% des Gesamtkollektivs) waren vier oder mehr Lymphknoten befallen. Fernmetastasen in Knochen, Lunge, Leber und Haut fanden sich bei acht Patientinnen (6,25%).

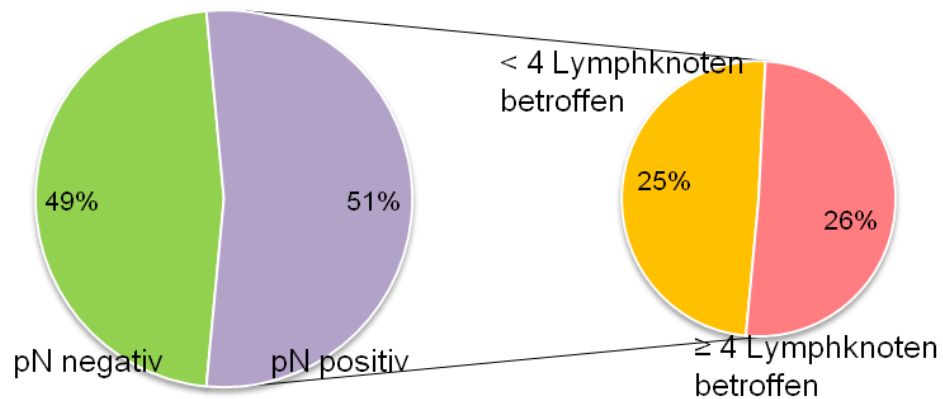


Abb. 7: Nodalstatus

Hormonrezeptorstatus

Insgesamt hatten 109 Tumore (85,16%) einen positiven Hormonrezeptorstatus. Davon waren 91 (83,47%) für beide, 16 (12,43%) nur für Östrogen und 2 (18,35%) nur für Progesteron positiv. 19 Tumore (14,84%) hatten einen negativen Hormonrezeptorstatus.

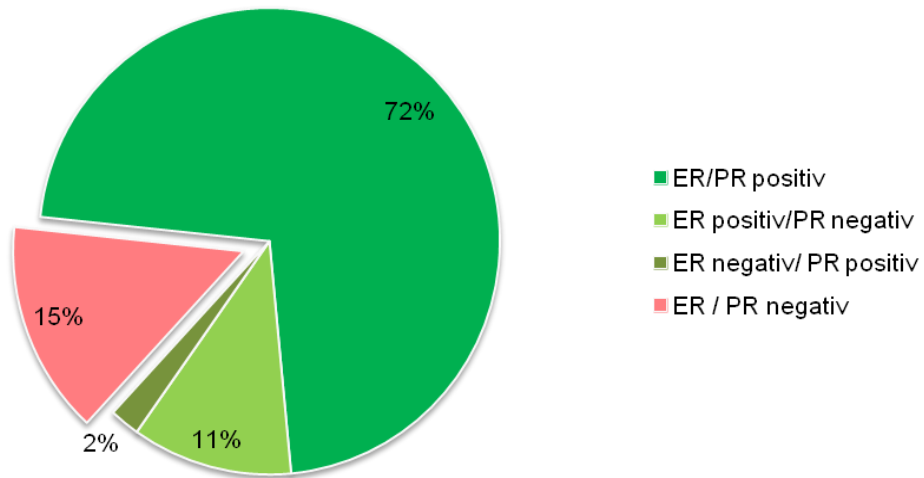


Abb. 8: Prozentuale Verteilung des Hormonrezeptorstatus

3.2 Prävalenz der Genaberrationen

HER2/neu

In der FISH-Analyse konnten 20 HER2-amplifizierte Karzinome (15,63%) nachgewiesen werden. Die übrigen 108 Tumore (84,37%) waren negativ. Immunhistochemisch waren 21 HER2 positive (16,41%) und sieben schwach positive Mammakarzinome (5,47%) vorbeschrieben. Von den 24 immunhistochemisch positiven Tumoren waren 12 auch in der FISH-Analyse positiv (50,0%). Unter den sieben immunhistochemisch schwach positiven (2+) Karzinomen waren zwei FISH positiv (28,57%). Ein Beispiel für einen unauffälligen Genstatus bzw. eine HER2-Amplifikation zeigen die Abbildungen 9 und 10.

FISH	Positiv	Negativ	Gesamt
IHC			
2+	2	5	7
3+	12	11	21
Negativ	6	104	100
Gesamt	20	108	128

Tabelle 13: Vergleich der Ergebnisse von IHC und FISH-Analyse für den HER2-Status

TOP2A

Die FISH-Analyse für die TOP2A-Amplifikation ergab sieben positive Karzinome (5,47%). Alle sieben positiven Proben zeigten eine Koamplifikation mit HER2. 35,0% der HER2-amplifizierten Tumorproben waren damit koamplifiziert mit TOP2A. Ein Beispiel für eine Koamplifikation zeigt Abbildung 11.

TOP2A	Positiv	Negativ	Gesamt
HER2			
Positiv	7	13	20
Negativ	0	108	108
Gesamt	7	121	128

Tabelle 14: Vergleich der Genamplifikationen von HER2 und TOP2A

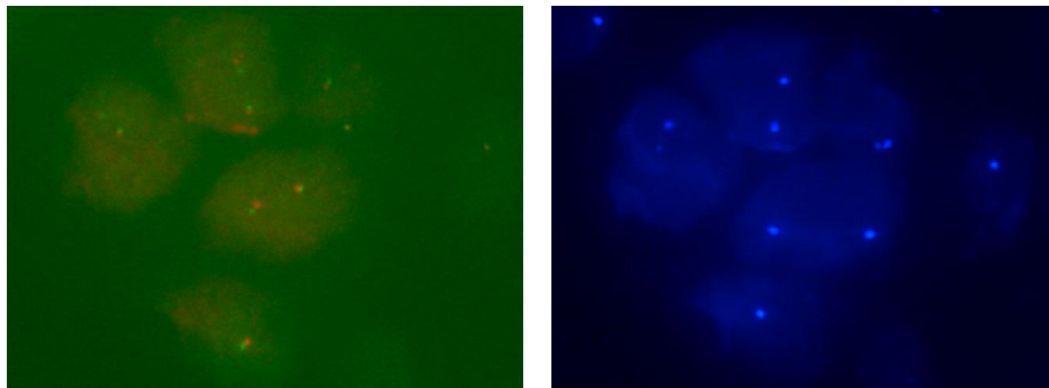


Abb. 9: Beispiel für einen unauffälligen Genstatus mit je einem bzw. zwei Signalen pro Zelle. Rot= TOP2A, grün= HER2 und blau= CEP17. 1000fache Vergrößerung

HER2/neu-Amplifikation

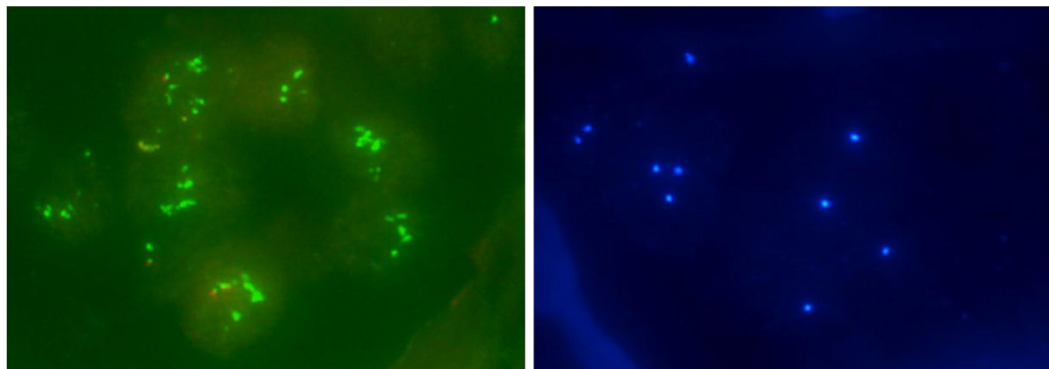


Abb. 10: Beispiel für eine HER2-Amplifikation mit vielen grünen Signalen (HER2) und 1- 2 roten (TOP2A) bzw. blauen (CEP17) Signalen pro Zelle; 1000fache Vergrößerung.

Koamplifikation

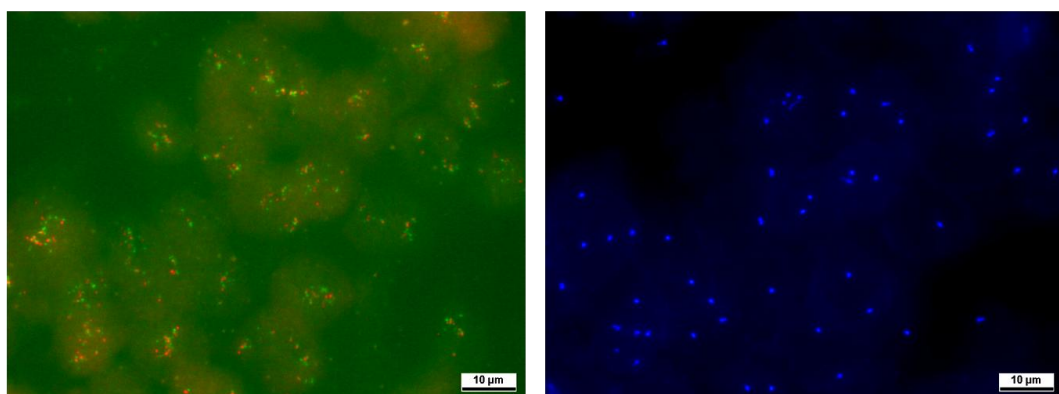


Abb. 11: Beispiel für eine Koamplifikation mit vielen roten (TOP2A) bzw. grünen (HER2) Signalen und 1-2 blauen (CEP17) Signalen pro Zelle, 1000fache Vergrößerung.

3.3 Untersuchungen zur Prognose

3.3.1 Verteilung der Prognoseparameter und Korrelation mit dem Genstatus

Die Patientengruppen wurden auf Verteilungsmuster hinsichtlich der Prognosefaktoren überprüft (Tab. 15). Im Zusammenhang mit beiden Genaberrationen finden sich gehäuft entdifferenzierte Karzinome. Statistisch wird dies in unserem Kollektiv wegen kleiner Fallzahlen nicht untermauert. Desweiteren sind in der HER2-Gruppe gehäuft 4 oder mehr Lymphknoten befallen. Auch dies weist keine statistische Signifikanz auf. Mit ca. 39% ist der Anteil an Karzinomen mit einem negativen Hormorezeptorstatus in der HER2-Gruppe erhöht. Auch hier findet sich keine statistische Signifikanz, jedoch ein statistischer Trend ($p=0,076$). Bei allen Patientinnen mit koamplifizierten Tumoren waren die Lymphknoten befallen und der Hormonrezeptorstatus positiv. Der Lymphknotenstatus und die TOP2A-Amplifikation korrelieren statistisch signifikant ($p=0,015$).

		Gesamtes Kollektiv		Kontrolle			HER2-Amplifikation				Koamplifikation	
		n=128		n= 108	(84,37%)	p- Wert	n=13	(10,16%)	p- Wert	n=7	(5,47%)	p- Wert
Alter	≤35	1	(0,78%)	0	(0,00%)	1,00	1	(7,69%)	0,58	0	(0,00%)	1,00
	≤ 50	23	(17,97%)	19	(17,59%)		3	(23,08%)		1	(14,29%)	
	> 50 Jahre	104	(81,25%)	89	(82,41%)		9	(69,23%)		6	(85,71%)	
Grading	1	12	(9,38%)	11	(10,19%)	0,86	1	(7,69%)	0,47	0	(0,00%)	
	2	51	(39,84%)	46	(42,59%)		3	(23,08%)		2	(28,57%)	
	3	65	(50,78%)	51	(47,22%)		9	(69,23%)		5	(71,43%)	
T-Status	1	61	(47,66%)	54	(50,00%)	0,99	5	(38,46%)	0,78	2	(28,56%)	0,85
	2	44	(34,37%)	35	(32,41%)		6	(46,15%)		3	(42,86%)	
	3	4	(3,13%)	3	(2,78%)		0	(0,00%)		1	(14,29%)	
	4	19	(14,84%)	16	(14,81%)		2	(15,39%)		1	(14,29%)	
N-Status	negativ	63	(49,22%)	56	(51,85%)	0,79	7	(53,85%)	0,75	0	(0,00%)	0,015
	≤ 3	32	(25,00%)	25	(23,15%)		2	(15,38%)		5	(71,43%)	
	>4	33	(25,78%)	27	(25,00%)		4	(30,77%)		2	(28,57%)	

Tabelle 15: Verteilung der Parameter und Korrelation mit dem Genstatus (χ^2 - Test, Fischer's exakter Kontingenztafel Test)

		Gesamtes Kollektiv		Kontrolle			HER2-Amplifikation				Koamplifikation	
M-Status	M0	120	(93,75%)	102	(94,44%)	1	12	(92,31%)	0,70	6	(85,71%)	0,96
	M1	8	(6,25%)	6	(5,56%)		1	(7,69%)		1	(14,29%)	
Hormonstatus	ER+/PR+	91	(71,1%)	82	(75,93%)	0,82	6	(46,15%)	0,076	3	(42,86%)	0,47
	ER+/PR-	16	(12,50%)	10	(9,26%)		2	(15,39%)		4	(57,14%)	
	ER-/PR+	2	(1,56%)	2	(1,85%)		0	(0,00%)		0	(0,00%)	
	ER-/PR-	19	(14,84%)	14	(12,96%)		5	(38,46%)		0	(0,00%)	
Risiko/aktuell	niedrig	10	(7,81%)	10	(9,26%)	0,70	0	(0,00%)	0,58	0	(0,00%)	0,03
	mittel	75	(58,59%)	67	(62,04%)		7	(53,85%)		0	(0%)	
	hoch	43	(33,60%)	31	(28,70%)		6	(46,15%)		7	(100%)	
Risiko 2003	Niedrig	11	(8,59%)	10	(9,26%)		1	(7,7%)		0	0%	
	Mittel	53	(41,41%)	46	(42,59%)		6	(46,15%)		0	0%	
	Hoch	64	(50%)	52	(48,15%)		6	(46,15%)		7	(100%)	

Tabelle 15: Verteilung der Parameter und Korrelation mit dem Genstatus (χ^2 - Test, Fischer's exakter Kontingenztafel Test)

3.3.2 Einschätzung des Rückfallrisikos 2003 und 2015

Anhand der im Rahmen der St. Gallen Konsensus Konferenzen von 2003 und 2007 postulierten Parameter, wie Alter bei Erstdiagnose, Grading-Score, Tumorausdehnung, Lymphknotenstatus, Hormonrezeptorstatus und HER2-Status, wurden alle Patientinnen in drei Risikogruppen eingestuft [43], [45]. In Tabelle 15 findet sich eine genaue Auflistung der Verteilung in den verschiedenen Gruppen. Eine Veränderung der Risikoeinteilung ist auf die Einführung von HER2 zurückzuführen. In unserem Kollektiv führte dies bei einer Patientin zu einem Aufstieg vom niedrigen zu mittlerem Risiko. Bei drei Patientinnen führt der dreifach negative Rezeptorstatus (Hormon- und HER2 negativ) zu einem hohen Rezidivrisiko. Die Unterscheidung, wie viele Lymphknoten befallen sind, lässt 24 Patientinnen nun dem mittleren Rezidivrisiko zuordnen, im Gegensatz zu einem vormals hohen Risiko. Diese Veränderungen drücken sich in einem Anstieg des mittleren Rezidivrisikos und einem Abfall beim hohen Rezidivrisiko um jeweils etwa 17% aus, die sich insbesondere in der Kontrollgruppe niederschlagen. In der Gruppe mit HER2-Amplifikation wurde 2003 bei einer Patientin noch ein niedriges Rückfallrisiko angenommen, wohingegen nun auf Grund des HER2-Status von einem mittleren Rückfallrisiko ausgegangen wird. In der Gruppe mit Ko-Amplifikation gab es keine Veränderungen hinsichtlich des geschätzten Rückfallrisikos (Abb. 12).

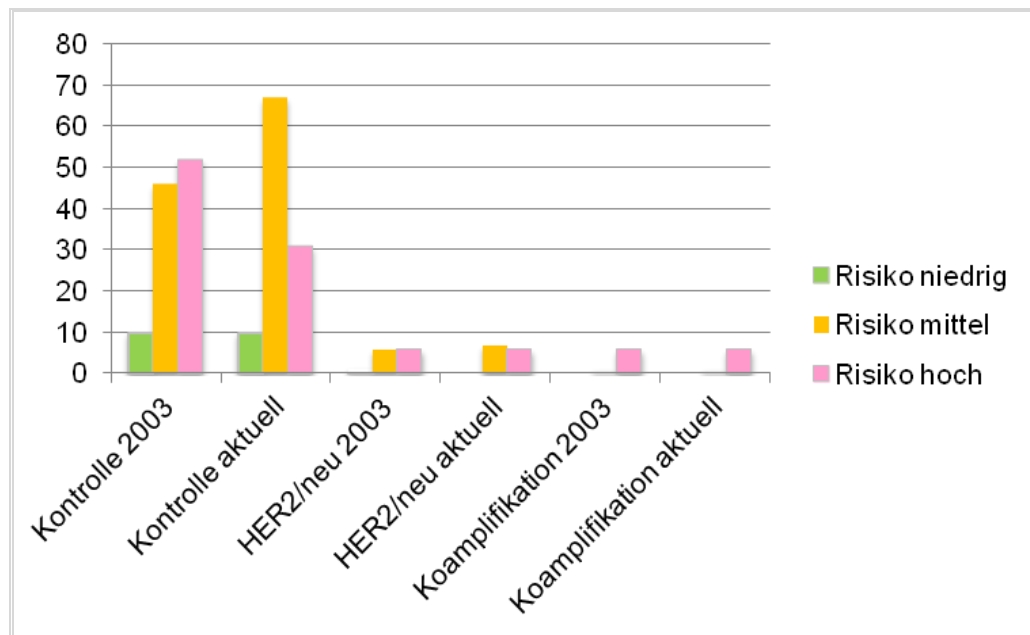


Abb. 12 Vergleich der aktuellen Risikoeinschätzung mit 2003

3.3.3 Korrelation des Überlebens mit Prognosefaktoren und Genaberrationen

Im Beobachtungszeitraum von fünf bis sechs Jahren nach Erstdiagnose konnte die klinische Entwicklung von 128 Patientinnen verfolgt werden. Die Beobachtungsspanne reichte von vier bis zu 79 Monate nach Diagnosestellung. Die mediane Nachbeobachtungszeit im Gesamtkollektiv betrug 59 Monate für das krankheitsfreie Überleben (DFS) und 60 Monate für das Überleben (OS).

Um die prognostische Relevanz zu prüfen, wurde das Outcome mittels Log-rank-Test und den verschiedenen Parametern korreliert. In Bezug auf das rezidivfreie Überleben und Überleben zeigten alle bekannten prognostischen Faktoren (außer dem histopathologischen Grading bezüglich des DFS) eine statistische Signifikanz.

Auch die aktuelle Risikoeinschätzung bzw. die von 2003 wurden auf ihre prognostische Relevanz geprüft. Während die Risikoeinschätzung von 2003 keine

statistische Signifikanz erreichte, gelang dies bei der Klassifizierung von 2007 ($p=0,012$ für das DFS und $p=0,015$ für das OS, Tab. 16).

	DFS			OS		
Patientencharakteristika	N	Events	p- Wert	N	Events	p- Wert
T-Stadium						
T1	61	8	0,004	61	5	0,012
T2	44	11		44	10	
T3	4	2		4	2	
T4	19	10		19	7	
gesamt	128	31				
Grading						
G1	12	2	0,068	12	1	0,01
G2	51	8		51	4	
G3	65	21	NS	65	19	
gesamt						
Lymphknoten						
pN0	64	10	0,005	64	7	0,008
≤ 3 LK pos	31	6		31	5	
> 4 LK pos	33	15		33	12	
HR						
pos	109	22	0,04	109	17	0,04
neg	19	9		19	7	
HER2						
amplifiziert	20	7	0,28	20	6	0,185
nicht amplifiziert	108	24		108	18	
TOP2A						
koamplifiziert	7	2	0,464	7	2	0,4
nicht amplifiziert	121	29		121	22	
Risiko Aktuell						
niedrig	10	2	0,012	10	1	0,015
mittel	75	12		75	9	
hoch	43	17		43	14	
Risiko 2003						
niedrig	11	1	0,122	11	1	0,164
mittel	53	9		53	6	
hoch	64	21		64	17	

Tabelle 16: Korrelation von Prognosefaktoren, Genaberration und Rezidivrisiko mit dem Überleben mittels Log-Rank-Test nach Peto-Pike

Die Genaberrationen wiesen keine statistische Signifikanz bezüglich des Überlebens auf. Das mittlere Überleben beider Gruppen mit Genaberration war im Vergleich zur Kontrollgruppe um 4-14 Monate reduziert, jedoch konnte im Log-Rank-Test keine statistische Signifikanz gezeigt werden (Tab. 16).

Da die drei Patientengruppen bezüglich der Prognosefaktoren heterogen und damit wenig vergleichbar sind, wurde das Outcome mit dem Risikoprofil korreliert. In der Hochrisikogruppe beider Klassifikationen weisen Patientinnen mit HER2-Amplifikation erwartungsgemäß ein verkürztes Überleben von bis zu 16 Monaten im Vergleich zu den beiden anderen Gruppen auf. Statistische Signifikanz wird nicht erreicht (Tab. 17).

	Mittleres Überleben in Monaten		Mittleres krankheitsfreies Überleben in Monaten	
Alle Risikogruppen		p-Wert		p-Wert
Koamplifikation	65	0,464	59	0,4
HER2	59		50	
Kontrolle	69		64	
Hohes Risiko (aktuell)				
Koamplifikation	65	0,839	59	0,829
HER2	55		44	
Kontrolle	61		54	
Hohes Risiko (2003)				
Koamplifikation	57	0,674	63	0,386
HER2	44		55	
Kontrolle	60		67	

Tabelle 17: Korrelation des Überlebens mit Genaberration und Rezidivrisiko (Kaplan-Meier-Schätzer und Log-Rank-Test)

Multivariate Analyse mit Cox-Regression

Für die multivariate Analyse zur Testung der prognostischen Relevanz der Genaberrationen und der Risikoklassifizierung wurden Cox proportional hazard Modelle gebildet, in die zum einen Tumorstadium, Nodalstatus, histopathologisches Grading und der Hormonrezeptorstatus, zum anderen die Risikoklassifikationen und Genaberrationen eingebunden wurden. Die Modelle wurden sowohl für das krankheitsfreie Überleben als auch für das Überleben des gesamten Kollektivs gebildet.

Die Prognosefaktoren wurden hinsichtlich ihres prognostischen Wertes bestätigt. Auch die Risikobewertungen haben eine prognostische Aussagekraft, wobei für

das ältere Risikoprofil beim Überleben lediglich ein statistischer Trend ermittelt werden konnte. Die Genaberrationen zeigen keinerlei prognostische Wertigkeit.

	Parameter	β	SA	p-Wert	KI
DFS	G	0.7370	0.3781	0.05	-0.0041; 1.4781
	T-Stadium	0.4550	0.1943	0.02	0.0742; 0.8357
	N	0.2616	0.2497	0.01	-0.2277; 0.7510
	HR	0.6137	0.4176	0.02	-0.2047; 1.4321
	Risiko 2007	0.8645	0.3322	0.009	0.2134; 1.5156
	Risiko 2003	0.6656	0.3361	0.05	0.0069; 1.3244
	HER2	-0.4649	0.4306	0.28	-1.3080; 0.3791
	Koamplifikation	-0.2330	0.2913	0.42	-0.8040; 0.3380
OS	G	1.2902	0.4861	0.008	0.3374; 2.2431
	T-Stadium	0.5065	0.2295	0.03	0.0567; 0.9563
	N	0.2930	0.2886	0.01	-0.2727; 0.8587
	HR	0.4323	0.4859	0.03	-0.5200; 1.3846
	Risiko	0.9269	0.3997	0.02	0.1435; 1.7102
	Risiko 2003	0.6985	0.3933	0.08	-0.0724; 1.4695
	HER2	-0.2493	0.4951	0.62	-1.2196; 0.7210
	Koamplifikation	-0.0771	0.3261	0.81	-0.7163; 0.5621

Tabelle 18: Prognosefaktoren/ Cox-Regression

3.4 Untersuchungen zum prädiktiven Wert

Vergleich der Patientinnen in den Behandlungsgruppen

Um die Vergleichbarkeit der Therapieregime zu überprüfen, untersuchten wir die Verteilung der prognostischen und prädiktiven Marker in den vier Kollektiven (Tab. 19).

	EC/FEC	TAC	CMF	keine
Alter/Median	58	60	78	68
Alter/ Range	35-76	44-69	71-84	41-98
G3	59%	70%	100%	41%
T3/T4	30%	30%	50%	8%
M	2%	15%	0%	1%
≥4LK pos	34%	70%	100%	10%
Multifokal	10%	40%	0%	10%
HR pos	80%	58%	50%	95%
HER2 pos	13%	18%	0%	15%
TOP2A pos	3%	3%	0%	5%

Tabelle 19: Verteilung der Parameter in den Therapiegruppen. Alter in Jahren

Dabei fand sich ein jüngeres medianes Alter bei Patientinnen, die mit einem anthrazyklinbasierten Regime behandelt wurden. In allen Gruppen, die eine adjuvante zytostatische Therapie erhielten, fand sich erwartungsgemäß eine höhere Risikokonstellation, die sich in einem höheren prozentualen Anteil an G3-Karzinomen, einem höheren T-Stadium, positiven Lymphknotenbefall und einem negativen Hormonrezeptorstatus ausdrückt. Insbesondere bei Patientinnen, die mit einem Taxan behandelt wurden, fanden sich gehäuft primär metastasierte Mammakarzinome. Beim Vergleich der beiden anthrazyklinbasierten Therapieregime fand sich ein größerer Anteil an schwerwiegenden Kriterien (wie G3, hochgradiger Lymphknotenbefall, Hormonrezeptornegativität) in der TAC-Gruppe. Die Genaberrationen waren, ausgenommen in der CMF-Gruppe, annähernd gleich verteilt.

Einfluss der zytostatischen Therapie auf das Überleben von Patienten mit Genaberration

Die Kernfrage dieser Analyse war, ob eine TOP2A-Amplifikation eine Aussage über den Erfolg der anthrazyklinbasierten Therapie erlaubt. Dafür wurde überprüft, ob sich die Überlebenszeiten in Abhängigkeit der erhaltenden Chemotherapie verändern. Dies erfolgte sowohl im gesamten Kollektiv als auch

in den einzelnen Kollektiven. Wie im vorangehenden Abschnitt beschrieben, fanden sich erhebliche Unterschiede zwischen den Patientinnen der vier Behandlungsgruppen. Um eine Vergleichbarkeit zu gewährleisten, wurden die Patientinnen mit hohem und mittlerem Rezidivrisiko (nach der Risikoeinschätzung von St. Gallen 2007) unterschieden. Für die univariate Analyse wurde der χ^2 -Test, Log-Rank Test/ Peto-Pike und Kaplan-Meier Schätzer verwendet (Abb. 13-18).

Überleben im gesamten Kollektiv in Abhängigkeit der adjuvanten Chemotherapie

Für das gesamte Kollektiv fanden sich zwischen anthrazyklinbasierter Therapie und keiner Chemotherapie annähernd gleiche 5-Jahres-Überlebensraten (85% ohne CHT, 88% nach EC/FEC), was jedoch nicht statistisch untermauert wird (Abb. 13). Bei der Differenzierung zwischen TAC und EC/FEC sind die Überlebenszeiten nach TAC statistisch signifikant verkürzt ($p < 0,05$ im χ^2 - und Log-Rank Test). Auch nach CMF sind die Überlebenszeiten verkürzt, hier mit einem statistischen Trend ($p = 0,08$). Für die verlängerten Überlebenszeiten nach EC/FEC fand sich keine Signifikanz. Im multiplen Vergleich war keine Therapie statistisch signifikant unter- bzw. überlegen.

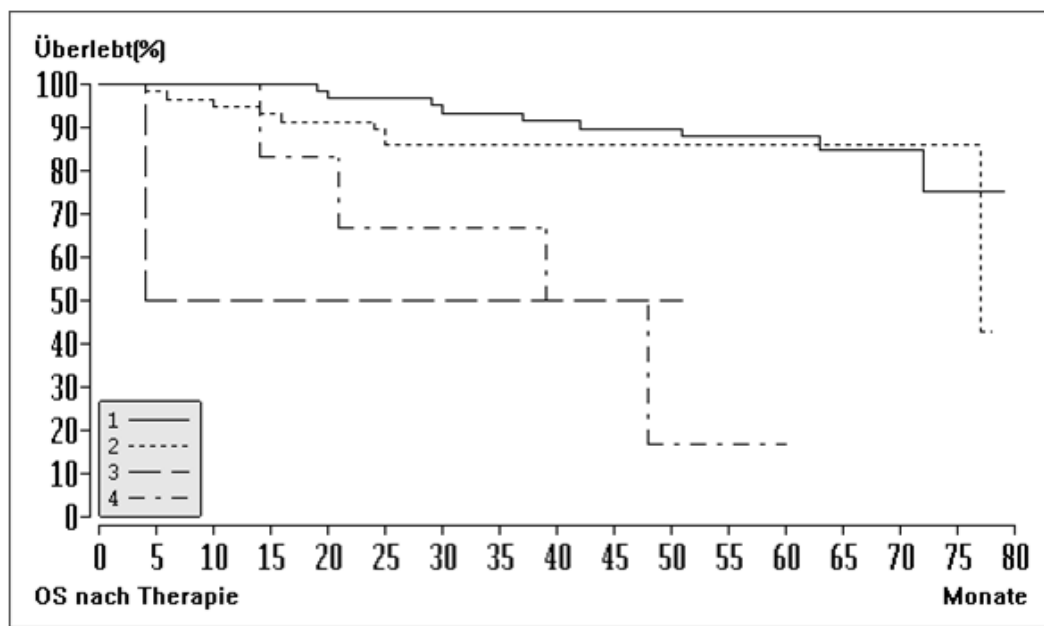


Abb. 13: Überleben aller Patientinnen (n= 128) in Abhängigkeit der Therapie. 1= EC/FEC (n=64). 2=keine CHT (n=58). 3= CMF (n=2). 4= TAC (n=6)

Überleben im Kontrollkollektiv in Abhängigkeit der adjuvanten Chemotherapie

Die Überlebenszeitanalyse der Kontrollgruppe lieferte ähnliche Ergebnisse wie die des gesamten Kollektivs. In allen Selektionen (gesamt, hohes und mittleres Risiko) waren die Überlebenszeiten nach TAC statistisch signifikant reduziert. Im multiplen Vergleich jedoch war die Therapie mit EC/FEC bei Hochrisiko-Patientinnen statistisch signifikant mit einem verlängerten Überleben assoziiert ($p= 0,02$, Abb. 14). Für die Patientinnen mit mittlerem Risiko konnte dies nicht gefunden werden (Abb. 15).

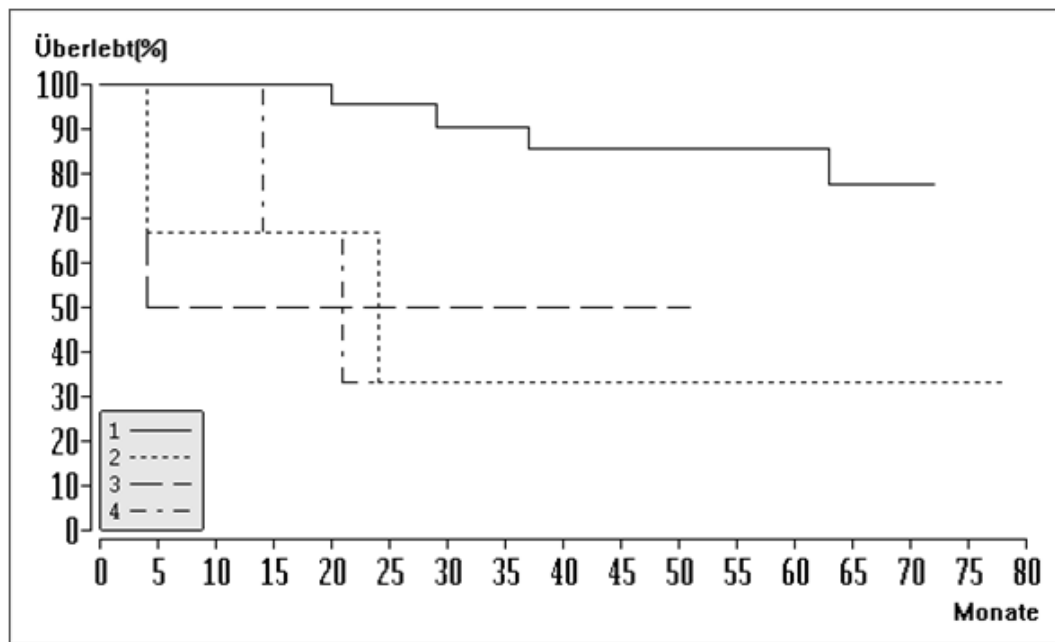


Abb. 14: Kaplan- Meier- Schätzer: Überleben bei HER2-negativen Karzinom (n=36) mit hohem Rezidivrisiko nach Chemotherapie. 1= EC/FEC (n=26). 2= keine (n=6). 3= CMF (n=2). 4= TAC (n=2).

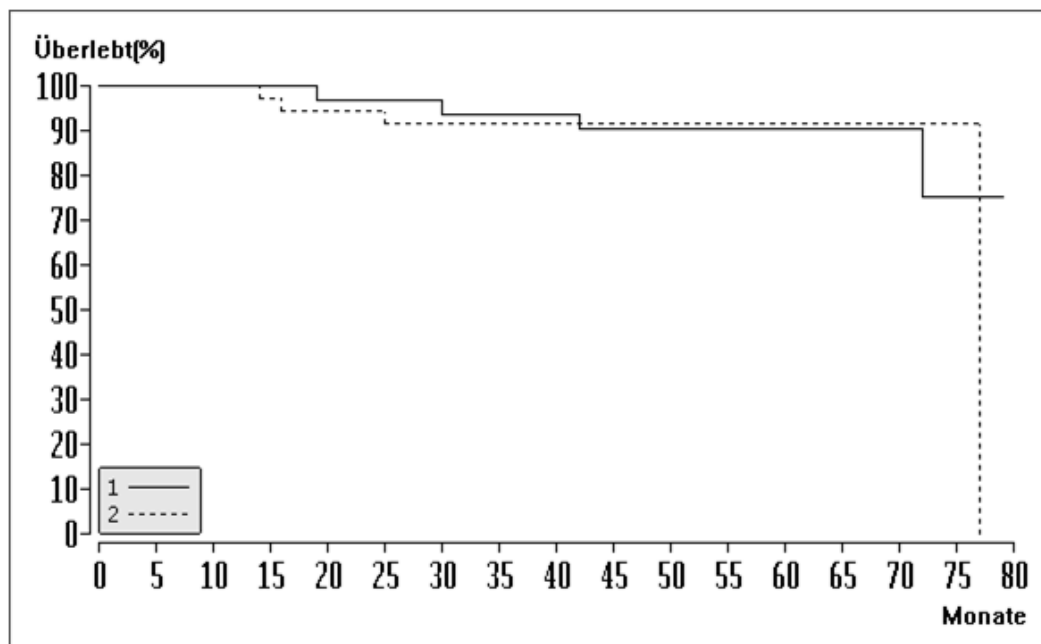


Abb. 15: Kaplan- Meier- Schätzer: Überleben bei HER2-negativen Karzinom mit mittlerem Risiko (n=59) nach Chemotherapie. 1= EC/FEC (n=26). 2= keine (n=33).

Überleben bei HER2- bzw. HER2/TOP2A-Koamplifikation in Abhängigkeit der adjuvanten Chemotherapie

Beim Vergleich aller anthrazyklinhaltigen Therapien mit keiner Therapie waren die Überlebenszeiten in den Gruppen mit Genaberrationen annähernd gleich. Bei Unterscheidung der Kollektive, die EC/FEC und TAC erhielten, zeigte sich ein anderes Bild. Die Überlebenszeiten nach EC/FEC waren im Vergleich zu keiner Therapie mit einem verlängerten Überleben um im Mittel 13 Monate assoziiert (Abb. 16 bis 18). Statistische Signifikanz wurde nicht erreicht. Das Überleben nach TAC-Therapie war in allen Selektionen statistisch signifikant reduziert.

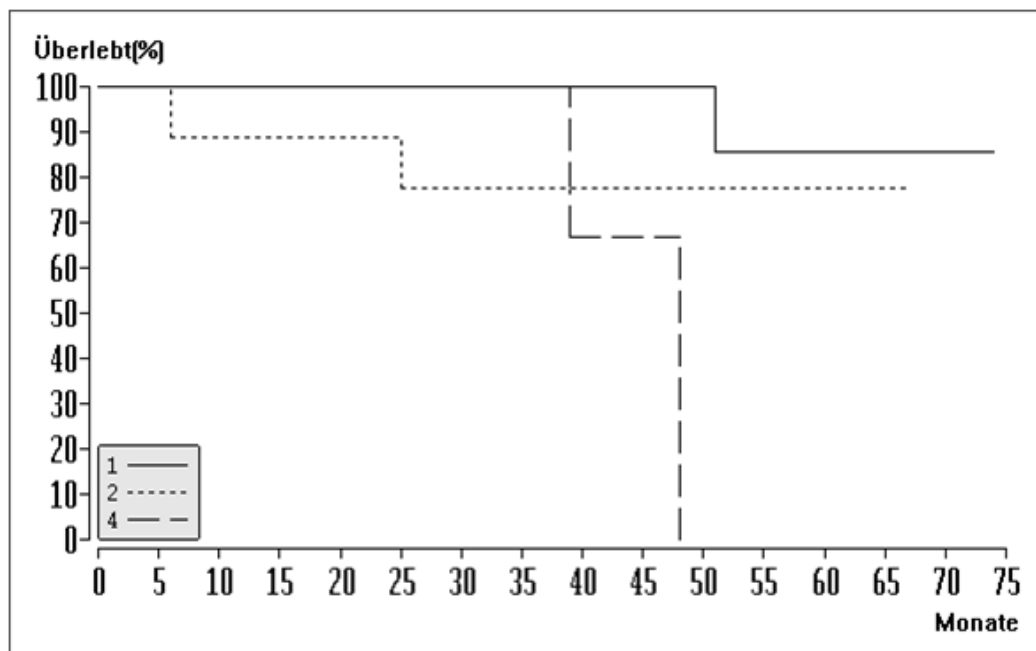


Abb. 16: Kaplan-Meier-Schätzer: Überleben bei HER2-positiven Karzinomen (n=13) in Abhängigkeit zur adjuvanten Chemotherapie. 1= EC/FEC (n=6). 2= keine CHT (n=6). 4= TAC (n=1).

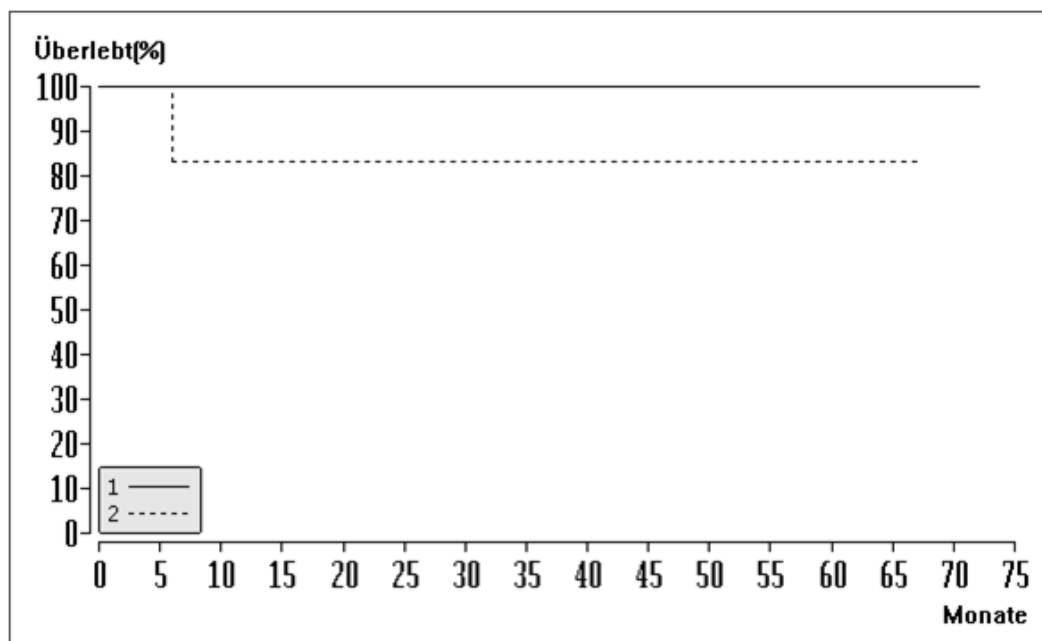


Abb. 17: Kaplan-Meier-Schätzer: Überleben bei HER2-positiven Karzinomen mit mittlerem Risiko (n=7) in Abhängigkeit zur adjuvanten Chemotherapie. 1= EC/FEC (n=2). 2= keine CHT (n=5).

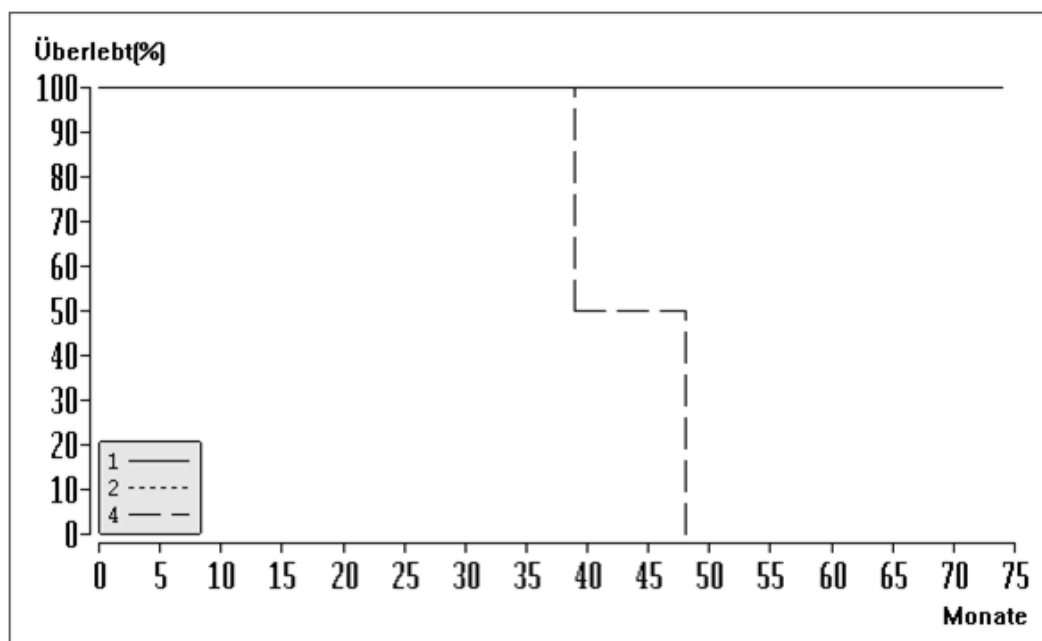


Abb. 18: Kaplan-Meier-Schätzer: Überleben bei komplizierten Tumoren (n=7) mit hohem Rezidivrisiko in Abhängigkeit zur adjuvanten Chemotherapie. 1= EC/FEC (n=2), 2= keine (n=3). 3= TAC (n=2). Kurve 1 und 2 weisen denselben Verlauf auf, so dass nur eine Linie sichtbar ist.

Überleben nach anthrazyklinbasierter Chemotherapie in Abhängigkeit der Genaberrationen

Um den prädiktiven Wert der Genaberrationen, insbesondere der TOP2A-Amplifikation zu testen, wurde das Überleben aller Patientinnen, die ein anthrazyklinbasiertes Chemotherapieregime erhielten, mit den Genaberrationen mittels Log-Rank-Test korreliert. Die getrennte Berechnung für EC/FEC und TAC war rechnerisch wegen zu kleiner Fallzahlen nicht möglich, so dass alle anthrazyklinhaltigen Regime gemeinsam analysiert wurden. Der Genstatus war nicht mit dem Überleben korreliert (s. Tab. 21).

Anthrazyklinhaltige CHT	DFS			OS		
	RH	95% KI	p-Wert	RH	95% KI	p-Wert
Koamplifikation vs. HER2	1,72	0.25, 11.91	0.58	19.58	0.29, 13.40	0.49
Koamplifikation vs. Kontrolle	20.12	0.47, 8.59	0.35	26.36	0.61, 11.35	0.19
HER2 vs. Koamplifikation	0.58	0.08, 4.04	0.58	0.51	0.07, 3.50	0.49
HER2 vs. Kontrolle	11.08	0.25, 4.87	0.89	14.54	0.32, 6.58	0.63
Log Rank Test:	Peto-Pike's Chi ² = 0.94 mit df = 2 und p = 0.63			Peto-Pike's Chi ² = 1.88 mit df = 2 und p = 0.39		

Tabelle 21: Korrelation des Überlebens nach anthrazyklinbasierter CHT mit dem Genstatus (Log-Rank-Test/ PetoPike und Relative Hazards/RH im 95% Konfidenzintervall)

Für die multivariate Analyse zur Testung des prädiktiven Werts der TOP2A-Amplifikation mit HER2-Amplifikation wurde ein Cox Regressionsmodell gebildet, in welches Genstatus und Risikoprofil einbezogen wurden. Das Risikoprofil ersetzte die Prognosefaktoren, da auf Grund der geringen Ereignisrate die Verwendung mehrerer Einflussvariablen das Modell erheblich schwächten. Die Modelle wurden je für das krankheitsfreie Überleben und Überleben nach anthrazyklinbasierter Therapie gebildet. Die Koamplifikation konnte in unserem Kollektiv nicht als Prädiktor für ein verbessertes Überleben nach anthrazyklinbasierter Chemotherapie bestätigt werden (Tab. 22).

	Prädiktor	Beta	SA	χ^2	p-Wert	95%-KI
DFS	Koamplifikation	0,92	0,92	0,99	0,32	-0.89; 2.72
	Risikoprofil	0,80	0,60	1,80	0,18	-0.37; 1.98
OS	Koamplifikation	0,61	0,92	0,43	0,51	-1.20;2.41
	Risikoprofil	0,62	0,69	0,80	0,37	0.73;1.96

Tabelle 22: Multivariate Analyse zum prädiktiven Wert der Koamplifikation und des Risikoprofils für ein verbessertes Überleben nach anthrazyklinbasierter Therapie.

4 DISKUSSION

Das HER2-positive Mammakarzinom wird standardmäßig mit einer anti-HER-Therapie (Trastuzumab für ein Jahr) behandelt. Auf Grund des erhöhten Rezidivrisikos wird zusätzlich eine Polychemotherapie durchgeführt, die leitlinienkonform ein Anthrazyklin enthält. Beide Substanzen (Trastuzumab und Anthrazyklin) gehen unabhängig voneinander mit kardiotoxischen Nebenwirkungen einher. Angesichts des verbesserten Langzeitüberlebens und des relativ jungen Alters unserer Patientinnen ist es erforderlich, die therapiebedingten Langzeittoxizitäten gegen den zu erwartenden Benefit sorgfältig abzuwägen. Aus diesem Grund wird ein prädiktiver Marker für den Nutzen einer anthrazyklinbasierten Therapie gesucht. Topoisomerase II α als Zielenzym der Anthrazykline bzw. die mit HER2 assoziierte TOP2A-Genamplifikation könnten als ein solcher Marker geeignet zu sein.

Als ein prädiktiver Marker sollte die TOP2A-Amplifikation folgende Bedingungen erfüllen:

1. Die TOP2A-Amplifikation definiert eine Subgruppe der HER2-positiven Tumore.
2. Die Untersuchungsmethode ist validiert und verfügbar.
3. Als Marker gibt sie zusätzlichen Informationsgewinn zu den bereits etablierten Markern.
4. Die Unabhängigkeit des Markers kann in einer multivariaten Analyse bestätigt werden.
5. Es besteht ein ausgewogenes Kosten-Nutzen-Verhältnis.

Definition des Patientenkollektivs

Da die duale Therapie mit Trastuzumab und anthrazyklinbasierter Therapie dem HER2-positivem Karzinom vorbehalten ist und in diesem Zusammenhang gehäuft kardiotoxische Nebenwirkungen auftreten, ist diese Patientengruppe für uns besonders relevant.

Im Gesamtkollektiv von 128 Patientinnen mit einem Mammakarzinom fanden wir bei 15,63% eine HER2-Amplifikation und bei 5,47% eine TOP2A-Amplifikation. Die TOP2A-Amplifikationen gingen immer mit einer HER2-Koamplifikation einher. Der Anteil dieser koamplifizierten Tumore unter den HER2-positiven Karzinomen betrug dabei ca. 35%.

In der Literatur wird eine HER2-Amplifikation bei 18-33% der Patientinnen beschrieben. Die Angaben zur TOP2A-Amplifikation bewegen sich zwischen 7-12% der untersuchten Tumorproben [57], [62]. Je nach Studie werden bei 37,5% bis 90% der TOP2A-Amplifikationen Koamplifikationen mit HER2 gefunden [21], [60], [63], [85], [5], [80]. Im Vergleich zu den Literaturangaben finden sich in unserem Kollektiv geringere Amplifikationsraten, die möglicherweise auf einen Selektionsbias zurückzuführen sind. Wie bereits gezeigt wurde, weisen HER2-positive Karzinome häufiger Lymphknotenbefall und Hormonrezeptornegativität auf [59], [116], [121]. Für die meisten Studien war der eine oder andere Parameter Einschlusskriterium. Unser Kollektiv ist in dieser Hinsicht unselektiert, so dass die Prävalenz niedriger ausfällt.

Die Angaben zur Koexistenz der beiden Genaberrationen sind widersprüchlich. Die meisten Studien kommen zu dem Schluss, dass die TOP2A-Amplifikation nur gemeinsam mit einer HER2-Amplifikation auftritt [58], [64], [23]. Im Rahmen der BCIRG005-Studie konnte keine einzige TOP2A-Genaberration bei 1.600 HER2-negativen Tumoren gefunden werden [112]. Auch Press et. al., die die FISH-Analyse mit Chromosom-Mapping validierten, fanden unter fast 5000 Mammakarzinomen keine isolierte TOP2A-Amplifikation [92].

Andere Studiengruppen wiederum fanden isolierte TOP2A-Amplifikationen bzw. Überexpressionen in bis zu 38% der HER2-negativen Tumorproben [51], [118]. Diese Widersprüche sind mutmaßlich auf methodische und untersucherbedingte Faktoren zurückzuführen. Bislang fehlt für die TOP2A-Bestimmung eine Validierung und Standardisierung der Untersuchungsmethoden sowie die Standardisierung der Grenzwerte und Signalinterpretationen [92], [56]. Betrachtet man die einzelne Studie, ist der Anteil der HER2-negativen und TOP2A-positiven Tumore jeweils gering, wie beispielsweise eine isolierte TOP2A-Amplifikation gegen 153 Koamplifikationen bei Tubbs et.al. oder 2 gegen 41 Koamplifikationen bei Harris et.al. [118], [51].

Vor diesem Hintergrund können wir konstatieren, dass die TOP2A-Amplifikation bis auf wenige Ausnahmen mit der HER2-Amplifikation einhergeht und somit eine Subgruppe der HER2-positiven Tumore darstellt.

Untersuchungsmethoden

Da wir HER2 mit TOP2A korrelieren wollten und die FISH-Analyse eine in der Auswertung weniger untersucherabhängige Methode ist, entschieden wir uns für dieses Verfahren. Darüber hinaus verwenden die meisten Studien die FISH-Analyse, so dass eine bessere Vergleichbarkeit der Ergebnisse gewährleistet ist. Im klinischen Alltag wäre die Bestimmung des HER2-/TOP2A-Status per FISH-Analyse eine pragmatische Lösung, da in einem Untersuchungsverfahren per Triple-Sonde beide Genaberrationen gleichzeitig untersucht werden könnten. Die Kosten der teureren FISH-Analyse gleichen die Kosten von zwei separat durchgeführten IHCs aus.

Die FISH-Analyse untersucht auf Genaberrationen. Sie ist relativ unabhängig von der Gewebeverarbeitung und möglichen Gewebeartefakten. Sie ist gut zwischen verschiedenen Untersuchern und Laboratorien reproduzierbar, da sie auf der Auswertung von Lichtsignalen basiert. Schwierigkeiten können dadurch entstehen, dass Tumorzellen in der Fluoreszenzmikroskopie nicht sicher

identifiziert werden oder die Tumorzellen einer Probe heterogen bezüglich der Genaberrationen sind. Sie ist im Vergleich zur IHC relativ teuer [56].

Die Hypothese unserer Studie war die Annahme, dass erhöhte Konzentrationen von Topoisomerase II α die Chemosensitivität auf Anthrazykline steigert. Prinzipiell muss diskutiert werden, ob die Genaberration von TOP2A auch zur vermehrten Proteinexpression von Topoisomerase II α führt, und damit als Prädiktor für die anthrazyklinbasierte Therapie geeignet ist. Die Genamplifikation muss jedoch nicht zwangsläufig mit einer gesteigerten Proteinüberexpression einhergehen [24], [75], [9], [99]. Verschiedene Studien fanden, dass Proliferationssignale die Proteinexpression unabhängig von Genamplifikation steigern können und damit zu erhöhten Konzentrationen von Topoisomerase II α führen [75], [25]. Außerdem ändert sich die Proteinkonzentration in Abhängigkeit des Zellzyklus. So finden sich beispielsweise in der G2/M-Phase die höchsten Proteinlevel, nach der Mitose sehr niedrige Proteinkonzentrationen [48]. Fehlende Genamplifikation lässt den Rückschluss auf normwertige Proteinkonzentrationen nicht zu [56].

Die kostengünstigere IHC untersucht die Konzentration des Genprodukts, erlaubt jedoch keine Aussage über dessen Aktivität. Technisch gesehen sind die Ergebnisse stark von der Gewebeverarbeitung und variierender Antikörperaktivität abhängig. Die Auswertung erfolgt als Schätzung und ist damit semiquantitativ. Aus diesen Gründen ist die IHC mit vermehrt falsch positiven und falsch negativen Ergebnissen assoziiert [102], [104], [77].

Wie in Tabelle 14 ersichtlich ist, besteht auch in unserer Studie eine Diskrepanz zwischen den Untersuchungsergebnissen der FISH-Analyse und der IHC. Insgesamt wurden gleich viele Karzinome HER2 positiv beurteilt, jedoch ist fast die Hälfte der Tumorproben in dem einen oder anderen Verfahren negativ. Es sei angemerkt, dass man sich 2003 und 2004 noch in der Phase der Testvalidierung befand. Qualitätssicherungsmaßnahmen wie interne Testvalidierung durch

Vergleich von IHC und (F)ISH, Mitführen von Kontrollen sowie jährliche Teilnahme an Ringversuchen haben zu einer besseren Übereinstimmung der Testverfahren geführt [102]. Unter diesen Voraussetzungen konnte inzwischen für HER2 eine gute Korrelation zwischen Genstatus und Proteinüberexpression gefunden werden, so dass beide Verfahren zur Bestimmung des HER2-Status zugelassen sind [104].

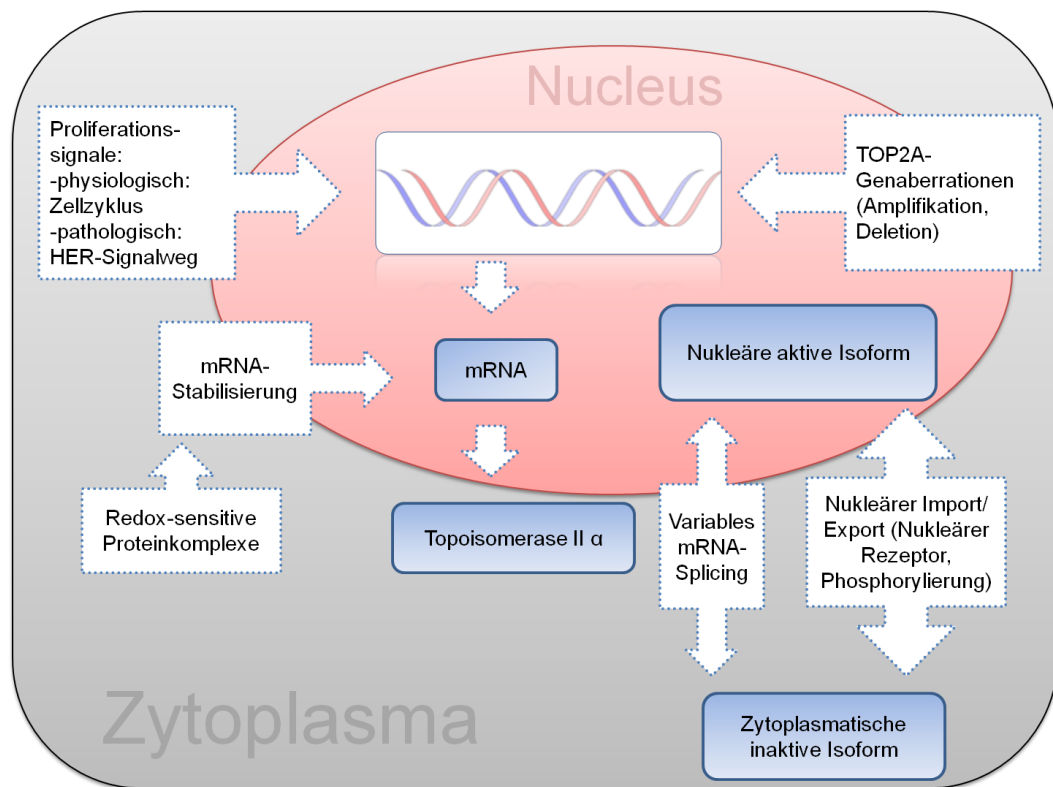


Abb. 19 Topoisomerase IIα-Signalweg (modifiziert nach Oakman et al., 2009 [77]).

Weitere Untersuchungsmethoden sind die RT-qPCR und DNA-Microarrays. Die Genexpression kann über die Bestimmung der mRNA per RT-qPCR oder DNA-Microarrays erfolgen. Mehrere Studien fanden eine gute Korrelation von mRNA und Proteinkonzentration [99], [73]. Ebenso wie bei der IHC kann jedoch nicht unterschieden werden, welche Isoform des Proteins vorliegt. Die Unterscheidung ist indes von klinischem Wert, da die im Zytoplasma vorliegende Topoisomerase IIα funktionell inaktiv und die nukleäre Isoform funktionell aktiv ist [122], [79], [33].

Für den TOP2A-Status konnte bisher keines der Untersuchungsverfahren standardisiert werden. Der Topoisomerase II α -Signalweg ist komplex und wird von vielen Faktoren beeinflusst (Abb. 19). Dies erklärt die Schwierigkeiten bei der Bestimmung des TOP2A-Status und die limitierte Aussagekraft der einzelnen Studien bzw. deren Vergleichbarkeit [56].

Prognostische und prädiktive Aussagekraft von TOP2A

Das Überleben mit und ohne anthrazyklinbasierter Therapie ist unter den Patientinnen mit koamplizierten Tumor gleich (100%). Auch im Vergleich zu den anderen Patientinnengruppen mit HER2-negativem bzw. -positivem Mammakarzinom finden wir keinen Hinweis auf ein verlängertes Überleben nach anthrazyklinbasierter Therapie. Auf der Grundlage dieser Daten können wir die TOP2A-Amplifikation nicht als prädiktiven Marker für die anthrazyklinbasierte Therapie bestätigen oder ausschließen. Dies ist verschiedenen Umständen geschuldet.

Die niedrige Prävalenz der TOP2A-Amplifikation von weniger als 10% des Gesamtkollektivs (siehe auch Absatz 4.1.) limitiert die Aussagekraft unserer Studie. Die Prävalenz der HER2- und TOP2A-Koamplifikation wird auf 35% unter den HER2-positiven Tumoren bzw. 5-8% aller Mammakarzinome geschätzt [92]. Das seltene Vorkommen dieses Markers limitiert die Ergebnisse der meisten Studien und erklärt die zum Teil widersprüchliche Datenlage. Für verlässliche Aussagen sind große prospektiv randomisierte Studien erforderlich. Es liegen aber derzeit nur retrospektive Analysen zu dieser Fragestellung vor.

Eine weitere Schwierigkeit ist der Einfluss der anderen Prognosefaktoren und adjuvanten Therapien. Um dies zu klären, untersuchten wir das Kollektiv hinsichtlich der Verteilung der etablierten Prognosefaktoren bzw. des Risikoprofils. Unabhängig der Genaberrationen konnten wir für die

Prognoseparameter (histopathologisches Grading, Lymphknotenmetastasen, Tumorgröße, Hormonrezeptorstatus und die Risikoeinschätzungen von 2003 und 2007) sowohl in der univariaten als multivariaten statistischen Analyse prognostische Relevanz nachweisen. In der HER2-Gruppe fand sich ein hoher Anteil an entdifferenzierten Karzinomen, positivem Lymphknotenbefall sowie Hormonrezeptornegativität. Jedoch nur für den negativen Hormonrezeptorstatus fand sich eine statistisch signifikante Korrelation mit dem HER2-Status. Der hohe Anteil an ungünstigen Prognosefaktoren führt zu einem höheren Anteil an Hochrisiko-Patientinnen bei HER2-Positivität, was durch verkürzte Überlebenszeiten unterstützt wird (bis zu 16 Monaten, ohne statistische Signifikanz). Auch die Koamplifikation mit TOP2A ging mit einem sehr hohen Anteil an entdifferenzierten Karzinomen einher (72% Koamplifikation vs. 47 % Kontrollkollektiv). Immer lagen Lymphknotenmetastasen vor, jedoch waren meistens weniger als drei Lymphknoten betroffen. Alle koamplifizierten Tumore waren hormonsensibel. Diese Verteilung der prognostischen Parameter resultiert in einer statistisch signifikanten Korrelation mit einem erhöhten Rezidivrisiko. Die Überlebenszeiten stellen sich jedoch anders als bei alleiniger HER2-Amplifikation dar. Im Vergleich zu den HER2-negativen Tumoren ist das Überleben um einige Monate verkürzt, aber gegenüber den allein HER2-positiven Karzinomen bis zu neun Monate verlängert (DFS: 59 Monate/ Koamplifikation, 50 Monate/ HER2, 64 Monate/ Kontrollkollektiv). Berücksichtigt man nur die Hochrisiko-Patientinnen, so ist das Überleben ohne HER2-Amplifikation bzw. mit HER2/TOP2A-Koamplifikation annähernd gleich bei verkürzten Überlebenszeiten bei allein HER2-positiver Erkrankung (DFS: 57 Monate/ Koamplifikation, 54 Monate/ Kontrollkollektiv, 44 Monate/ HER2). Statistische Signifikanz wird nicht erreicht. Das prognostische Verhalten der Koamplifikation ist anhand unserer Daten ungewiss. So finden wir zu 100% Hochrisiko-Patientinnen, was wesentlich auf die HER2-Amplifikation zurückzuführen ist. Ohne Berücksichtigung des HER2-Status wären fünf der sieben Frauen mit koamplifiziertem Mammakarzinom im mittleren Risikobereich. Gerade diese Patientinnen weisen einen guten klinischen Verlauf auf. Da alle koamplifizierten

Tumore auch endokrin responsiv waren, wurden sie dementsprechend systemisch behandelt. Frauen mit hormonpositivem Tumor weisen auf Grund der endokrinen Therapie eine bis zu 30%ige relative Risikoreduktion auf [28]. Unter den allein HER2-positiven Karzinomen fanden wir einen statistisch signifikant höheren Anteil an endokrin nicht sensitiven Karzinomen (ca. 38% vs. 12% Kontrollkollektiv und 0% Koamplifikation)). Der höhere Anteil an hormonpositiven Tumoren und die Verbesserung der Prognose durch eine systemische endokrine Therapie kann zu den verlängerten Überlebenszeiten der Patientinnen mit TOP2A-amplifizierten Tumoren geführt haben. Der Stichprobenumfang ist jedoch zu klein, um eine zufällige Verteilung auszuschließen.

Im Gegensatz zur HER2-Amplifikation, deren prognostischer Wert als gesichert betrachtet wird und dementsprechend Einzug in den klinischen Alltag gehalten hat, konnte dies für die TOP2A-Amplifikation nicht sicher gezeigt werden, und wird immer noch kontrovers diskutiert. Einige Autoren postulieren, dass TOP2A ein unabhängiger prognostischer Parameter ist. Im Rahmen des DBCG-Trial (DBCG89D) konnten unter 962 Hochrisiko-Patientinnen 90 (12%) mit TOP2A-Amplifikation bzw. 86 (11,1%) mit TOP2A-Deletion detektiert werden. Beide Genalterationen von TOP2A waren statistisch signifikant mit einer schlechteren Prognose und einem verkürzten rezidivfreien Überleben assoziiert [30]. Andere konnten diese These nicht unterstützen. Im Rahmen des Southwest Oncology Group Protocol S9313 (Intergroup Protocol 0137) wurden 2123 Frauen mit mittlerem Rezidivrisiko und äquivalenter adjuvanter Chemotherapie untersucht. Für die TOP2A-Alterationen konnte kein Einfluss auf die Prognose gefunden werden [21]. Wieder andere Autoren konnten demonstrieren, dass TOP2A-Amplifikationen statistisch signifikant mit einem positiven Hormonrezeptorstatus assoziiert sind. Als Subgruppe der HER2-positiven Tumore zeigte sich ein signifikant verbessertes Überleben [3]. Auch im Rahmen des BCIRG006 Trial zeigten die Frauen mit koamplifiziertem Tumor eine Reduktion des relativen Risikos im Vergleich zu Frauen mit allein HER2-positiven Karzinomen [112].

Diese Forschungsergebnisse dieser großangelegten Studien unterstützen den Eindruck, den wir durch die Pathomorphologie und den klinischen Verlauf von der Koamplifikation gewonnen haben. Möglicherweise definiert die TOP2A-Amplifikation eine Subgruppe der HER2-positiven Karzinome, die einen günstigeren Krankheitsverlauf auf Grund einer günstigeren Tumorbilogie haben.

Viele Arbeitsgruppen haben die Vorhersagekraft der HER2-Amplifikation für das Ansprechen auf die anthrazyklinbasierte Therapie untersucht. Es gibt eine Reihe von Studien, die letztlich nur statistische Trends erkennen konnten [84], [20], [93]. Im Jahr 2008 wurden zwei Meta-Analysen zu diesem Thema veröffentlicht [19], [40]. Dhesy-Thind et al. analysierten zehn Studien, die anthrazyklinbasierte Regime mit der CMF-Therapie verglichen. Sieben dieser Untersuchungen konnten allein keinen oder lediglich einen statistischen Trend zeigen. Durch die Metaanalyse wurde ein Benefit bei HER2-positiver Erkrankung unter anthrazyklinbasierter Therapie für das Gesamt- als auch für das rezidivfreie Überleben demonstriert. Wiederum war dieser Überlebensvorteil nicht bei HER2-negativen Karzinomen nachweisbar [19]. Die Metaanalyse von Gennari et al. umfasste im Wesentlichen dieselben Studien und bestätigte auch den prädiktiven Wert von HER2 für die Therapie mit Anthrazyklinen [40]. Die Ergebnisse dieser Metaanalysen ergeben, dass der Benefit einer anthrazyklinbasierten Chemotherapie auf Patientinnen mit HER2-positiver Erkrankung begrenzt ist.

Seit Anfang des neuen Jahrtausends wurde der Zusammenhang von TOP2A-Genalterationen und der Wirkung von anthrazyklinhaltiger Chemotherapie in vielen klinischen Studien untersucht. Eine Reihe dieser retrospektiven Studien, die zwei oder mehr adjuvante Chemotherapieregime miteinander verglichen, konnte den prädiktiven Wert statistisch untermauern [103], [101], [15], [85], [72], [117]. Auf Grund der niedrigen Prävalenz dieser Genaberration ist die statistische Aussagekraft all dieser Studien limitiert.

2010 wurden die Ergebnisse der Metaanalyse von fünf Phase III Studien, die CMF gegen CEF verglichen, vorgestellt. Das Kollektiv umfasste 3.452 Patientinnen, von denen 843 an HER2-amplifizierten bzw. 275 an koamplifizierten Tumoren erkrankt waren. Für die HER2- und TOP2A-Genamplifikation konnte jedoch lediglich ein klinisch moderater und statistisch grenzwertig prädiktiver Wert für die anthrazyklinbasierte Therapie gezeigt werden [23]. Um Kausalzusammenhänge zu klären, sind prospektive Studien erforderlich, die die nötige statistische Aussagekraft durch hinreichende Patientenzahlen aufweisen. Zur Klärung des prädiktiven Werts von TOP2A für die Komplettremission (pCR) nach anthrazyklinbasierter neoadjuvanter Chemotherapie verglichen Desmedt et. al. das Ausmaß der Tumorregression mit verschiedenen prädiktiven Markern, u.a. TOP2A-Status per FISH-Analyse und IHC. Bei 50% der TOP2A-amplifizierten Karzinome konnte eine komplette Tumorreduktion nach neoadjuvanter Epirubicin erzielt werden [18]. Auch Orlando et. al. untersuchten den prädiktiven Wert der TOP2A-Amplifikation für die pathologische Komplettremission nach neoadjuvanter anthrazyklinbasierter Therapie und fanden eine gute Korrelation des TOP2A-Genstatus mit der pCR [81]. Beide Studien sind durch die geringen Fallzahlen (23 Patientinnen bzw. 143 Patientinnen) limitiert und erfordern eine Überprüfung mittels prospektiver Studien mit angemessenen Patientenzahlen.

Erschwerend kommt hinzu, dass uns nur wenige effiziente Chemotherapieregime zur Verfügung stehen. Die Studien verglichen entweder verschiedene anthrazyklinbasierte Regime oder die anthrazyklinhaltige Chemotherapie mit dem weniger effektiven CMF. Zunächst wurde der Überlebensvorteil nach anthrazyklinbasierter Chemotherapie auf die HER2-positiven Tumore begrenzt. Verschiedene Studien konnten dies jedoch widerlegen. Dies betrifft insbesondere die Hochrisiko-Patientinnen mit triple-negativem Mammakarzinom [54]. Aus diesem Grund hat sich die anthrazyklinbasierte Therapie als derzeit beste Therapie bei allen Patientinnen mit entsprechendem Risikoprofil etabliert. Das CMF-Regime hat fast gänzlich an Bedeutung verloren [69].

Fehlende äquieffektive Chemotherapieregime beschränken die Aussagekraft der Studien hinsichtlich der Chemosensitivität von TOP2A-amplifizierten Tumoren. Es wurden synergistische Effekte von Trastuzumab mit platinhaltigen Verbindungen wie Cisplatin beobachtet [89]. Daher wurde im Rahmen des BCIRG006-Trials als anthrazyklinfreies Vergleichsregime Trastuzumab mit Carboplatin und Docetaxel ausgewählt. In dieser Studie wurden über 3000 Patientinnen mit HER2-positiver Erkrankung in eines der drei folgenden Therapieregime randomisiert: 1. Anthrazyklin plus Taxan (AC-T), 2. Anthrazyklin plus Taxan und Trastuzumab (AC-TH) oder 3. Taxan plus Trastuzumab und Carboplatin (TCH) als anthrazyklinfreies Regime. Für alle Frauen war die Zugabe von Trastuzumab mit einem statistisch signifikanten Überlebensvorteil assoziiert (DFS: 77% AC-T, 82% TCH, 83% AC-TH, $p < 0,0001$). Dabei war das Regime AC-TH dem TCH-Regime numerisch, aber nicht statistisch überlegen ($p < 0,42$). Das anthrazyklinfreie Regime dagegen ging mit signifikant weniger Nebenwirkungen, wie Herzversagen und Anthrazyklin assoziierter Leukämie, einher. Bei der Unterscheidung der Tumore mit und ohne TOP2A-Amplifikation fand sich ein statistisch signifikant verbessertes Überleben unabhängig der Therapie bei Koamplifikation (DFS: 84% Koamplifikation vs. 78% HER2, $p < 0,001$). Der deutliche Überlebensvorteil unter Trastuzumab war in dieser Gruppe nicht mehr zu verzeichnen ($p < 0,34$). Gerade bei Koamplifikation fand sich ein annähernd gleiches Überleben nach TCH und AC-T bei verbessertem Überleben nach AC-TH [112]. Um die TOP2A-Amplifikation und die vermutete Chemosensitivität gegenüber Anthrazyklinen eingehender zu klären, untersuchten Press et. al. die Tumorproben des BCIRG-005 und -006 Trial (insgesamt 4943 Proben) auf Prävalenz der Genaberrationen und korrelierten diese mit der Ansprechbarkeit auf Anthrazykline. Das Überleben bei HER2/TOP2A-Koamplifikation war nach der alleinigen Therapie mit Anthrazyklinen (AC-T) im Gegensatz zur allein HER2-positiven Erkrankung signifikant verbessert. Gleichzeitig profitierten die allein HER2-positiven Tumore von der Zugabe von Trastuzumab. Diesen Benefit erfuhren die Patientinnen mit koamplifiziertem Karzinom nicht [92]. Vor diesem Hintergrund argumentieren

Slamon und Press, dass der Überlebensvorteil der anthrazyklinbasierten Therapie bei HER2-positiver Erkrankung auf die Koamplifikation mit TOP2A zurückzuführen sei, also bei ca. 25-30% aller HER2-positiven bzw. 5-10% aller Mammakarzinome. Dieser Benefit, der dem Nutzen der anthrazyklinfreien, trastuzumabhaltigen Chemotherapie entspricht, wird mit signifikanten kurz- und langfristigen Nebenwirkungen, allen voran die Kardiotoxizität erkauft. Die Nebenwirkungen sind umso ausgeprägter, wenn beide Substanzen verabreicht werden. Auch wenn das Regime AC-TH den größten Benefit zeigte, ist nach Ansicht dieser Forschungsgruppe der Einsatz der Anthrazykline prinzipiell und insbesondere im Zusammenhang mit der anti-HER-Therapie zu überdenken [112], [92].

Die Langzeitmorbiditäten durch die duale Therapie mit Anthrazyklinen und Trastuzumab sind derzeit noch unbekannt. In der BCIRG006-Studie sind nach TCH 4 Patientinnen mehr in Folge des Mammakarzinoms verstorben als nach AC-TH. Keine einzige Patientin von über 3.000 ist wegen kardialer Nebenwirkungen verstorben. Jedoch war der Anteil an klinisch relevanter Herzmuskelschwäche im Sinne einer NYHA 3 und 4 in der ACTH-Gruppe fünfmal höher als in den beiden anderen Gruppen ($p < 0,0015$). Es fehlt eine risikoadaptierte Analyse der Überlebenszeiten von Patientinnen mit prognostisch ungünstigeren Tumoren bzw. kardial vorbelasteten Patientinnen mit prognostisch günstiger Tumorerkrankung, um diese Zusammenhänge eingehender zu klären.

Methodenkritik

Limitationen unserer Studie und deren Ergebnissen sind durch einige methodische Faktoren bedingt, die hier kritisch betrachtet werden sollen:

Die retrospektive Fall-Kontroll-Studie an sich birgt Schwierigkeiten und Fehlerquellen. Durch ungewollte Selektion der Gruppen können systematische Unterschiede entstanden sein, die die Ergebnisse verfälschen (Selektionsbias). Ein Teil der Informationen wurde per Befragung erworben, die durch ungenaue oder

unvollständige Erinnerung des Befragten systematisch verfälscht sein kann (Recall-Bias). Zusätzlich können unbekannte Faktoren (Confounder) bestehen, die die Erkrankung und den Therapieerfolg beeinflussen, und damit unsere Ergebnisse verzerren. Insbesondere im Hinblick auf die Einschluss- und Ausschlusskriterien (s. 2.2) sind verschiedene Szenarien denkbar, die zu solchen Verzerrungen geführt haben können.

Im Rahmen einer retrospektiven Fall-Kontroll-Studie hat man keinen Einfluss auf eine gleichmäßige Verteilung der Therapien. In unserem Kollektiv fand sich eine unerwartet ungünstige Verteilung der Chemotherapieregime. Nur zwei Frauen waren mit CMF, dagegen 63 Frauen mit einer anthrazyklinbasierten Therapie behandelt worden. Der angestrebte Vergleich von CMF mit einem anthrazyklinbasierten Regime war nicht durchführbar. Es konnte lediglich die anthrazyklinbasierte mit und ohne Taxan untereinander bzw. mit keiner zytostatischen Therapie verglichen werden. Dabei war die Frage zu beantworten, ob die Anthrazyklintherapie keiner Chemotherapie überlegen ist und ob eine der Patientengruppen im Vergleich zu den anderen ein verlängertes Überleben nach anthrazyklinbasierter Chemotherapie aufweist.

Die geringe Prävalenz der Genaberrationen von HER2 und TOP2A limitiert die statistische Aussagekraft unserer Studie. Eine zufällige Verteilung aller Parameter können wir daher nicht ausschließen.

Darüber hinaus darf der Einfluss der vielen Prognosefaktoren und diversen adjuvanten Therapien (antihormonelle Therapie, Radiatio, Chemotherapie) auf den klinischen Verlauf nicht ignoriert werden. Die gegenseitige Einflussnahme kann per multivariater Analyse abgeschätzt werden. Je mehr Variablen beachtet werden müssen, desto größer muss das Kollektiv sein, um die rechnerische Stabilität des Regressionsmodells zu erhalten. Als Grundregel gilt, pro 10 Ereignisse eine Variable zuzulassen [6]. Bei 10 bis max. 31 Ereignissen in unserer

Studie (Rezidiv oder Tod durch Mammakarzinom) war die Durchführung der multivariaten Analyse zwar möglich, aber in ihrer Aussagekraft begrenzt.

Das Gesamtkollektiv wurde in den untersuchten Charakteristika zur Demographie und Histopathologie sowie in der Prävalenz der Genaberrationen mit den Angaben der gängigen Literatur verglichen, um die Repräsentativität zu prüfen. Im Bezug auf das Alter entspricht unser Kollektiv einem normal verteilten Patientinnenkollektiv. Das mittlere Alter liegt je nach Studie zwischen 61 und 67 Jahre [95], [16]. In unserem Kollektiv lag es bei 63 Jahren und die Verteilung in den Altersklassen entspricht den Angaben in der Literatur. Beim histopathologischen Typing fanden wir einen höheren Anteil an invasiv duktalem Karzinomen (87% vs. 40-75% in der Literatur). Der Anteil der invasiv lobulären Karzinome entspricht in etwa der beschriebenen Inzidenz (11% vs. 5-15% in der Literatur) [69]. Bei einigen histologischen Typen, wie dem muzinösem als auch dem papillärem Karzinom, ist ein günstigerer Verlauf nachgewiesen worden [31], [100], [39]. In unserem Kollektiv fanden sich sowohl zwei muzinöse als auch ein papilläres Karzinom. Dieser geringe Anteil an prognostisch günstigen Karzinomen hat nach unserem Ermessen nur einen unwesentlichen Einfluss auf den klinischen Verlauf im Gesamtkollektiv. Bezüglich der weiteren prognostischen Faktoren gibt es wesentliche Verschiebungen. Beim histopathologischen Grading fanden wir in unserer Studie mehr mittelgradig differenzierte (40% vs. 30% in der Literatur) und weniger gut differenzierte (10% vs. 20% in der Literatur) Karzinome, wobei der Anteil der schlecht differenzierten (ca. 50%) Tumore in etwa den Angaben der Literatur entspricht [41]. Hinsichtlich des Hormonrezeptorstatus weist unser Kollektiv eine günstigere Verteilung auf. Über 70% der Karzinome waren östrogenrezeptorpositiv (vs. 66% in der Literatur), so dass ein hoher Anteil an Frauen mit einem günstigeren Risikoprofil vertreten war [4].

Therapieregime TAC

Beim Therapievergleich in unserer Studie fand sich ein statistisch signifikant verkürztes Überleben nach taxanhaltiger Polychemotherapie, unabhängig von Genalteration und Rezidivrisiko (OS nach 5 Jahren im Gesamtkollektiv <20%). Diese Ergebnisse widersprechen den Studienergebnissen des Oxford Overviews. Die EBCTCG führten eine Metaanalyse von 33 Studien mit insgesamt ca. 44.000 Patientinnen durch. Dabei zeigte sich, dass die Zugabe von Docetaxel zu einem anthrazyklinbasierten Regime zu einer relativen Risikoreduktion von 15-20% führt. Die reine anthrazyklinbasierte Therapie war nur dann gleichwertig, wenn sie mit einer höheren kumulativen Dosis (beispielsweise verkürzte Zeiten zwischen den Zyklen oder eine höhere Dosis) einherging [88]. Auf der Basis dieser Daten haben sich die Taxane als zytostatische Therapie in Deutschland und international etabliert [69].

Unser Patientenkollektiv, das mit Taxan behandelt worden war, weist insgesamt einen höheren Anteil an ungünstigen Prognosefaktoren auf (s. auch Tabelle 19 in Kapitel 3.4.). Im Vergleich zu den Patientinnen der Kontroll- bzw. EC/FEC-Gruppe finden sich mehr entdifferenzierte, hormonnegative sowie multifokale Karzinome. Auch wurden vermehrt Lymphknoten- und Fernmetastasen nachgewiesen. Von klinischer als auch histopathologischer Seite waren diese Patientinnen mit einer besonderen Schwere der Erkrankung belastet. Vermutlich war die taxan- und anthrazyklinbasierte Therapie damals als Maximaltherapie solchen Patientinnen vorbehalten. Die Vergleichbarkeit der Kollektive ist nicht gegeben, und wir erachten diese Ergebnisse als wenig aussagekräftig.

Schlussfolgerung und Ausblick

Der Stellenwert der TOP2A-Amplifikation als prädiktiver Marker für die anthrazyklinbasierte Therapie ist weiterhin unsicher.

Auf Grund der niedrigen Prävalenz sind für aussagekräftige Ergebnisse Studien mit großen Patientenkollektiven erforderlich. Die HER2- und damit die TOP2A-Amplifikation gehen mit einem erhöhten Rezidivrisiko einher. Sowohl in unserem Kollektiv als auch in anderen Studien werden bei Koamplifikation vermehrt günstige Parameter wie z.B. Hormonrezeptorpositivität und verlängerte Überlebenszeiten gefunden [3]. Das verbesserte Überleben kann Ausdruck einer prognostisch günstigen Tumorbiologie und/oder durch die adjuvante Therapie bedingt sein. Damit können die verlängerten Überlebenszeiten nach anthrazyklinbasierter Therapie verfälscht sein.

Auch wenn wir hinsichtlich des prädiktiven Werts von TOP2A für die anthrazyklinbasierte Therapie keine Aussage treffen konnten, unterstützen die Ergebnisse vieler Studien die Vorhersagekraft von TOP2A [92]. Aktuell stellt die anthrazyklinbasierte Therapie die beste zytostatische Behandlung dar, die wir Patientinnen mit entsprechender Tumorbiologie anbieten können [47]. Es fehlen vergleichbare anthrazyklinfreie Regime. Ohne diese ist ein Prädiktor für die anthrazyklinbasierte Therapie überflüssig. Das Regime Docetaxel-Carboplatin scheint diesbezüglich vielversprechend zu sein und wird derzeit in Studien überprüft [112]. Sollte dieses Regime oder auch ein anderes sich als ähnlich potent darstellen, kann der TOP2A-Status erneut auf seinen prädiktiven Wert untersucht werden. Möglicherweise sind wir dann in der Lage, durch den TOP2A-Status die Patientinnen mit dem größten Benefit für die anthrazyklinbasierte Therapie herauszufiltern und allen anderen die Nebenwirkungen zu ersparen.

5 ZUSAMMENFASSUNG

EINLEITUNG: Die medikamentöse Therapie des HER2-positiven Mammakarzinoms geht mit zwei unterschiedlichen Formen der Kardiotoxizität einher, die sowohl durch die anthrazyklinbasierte Chemotherapie als auch durch die anti-HER-Therapie mit Trastuzumab verursacht wird. Um diese zu reduzieren und trotzdem den größten Überlebensvorteil der Patientin zu gewährleisten, wird ein prädiktiver Marker für die anthrazyklinbasierte Therapie gesucht. Topoisomerase II α als Zielmolekül der Anthrazykline scheint als ein solcher Marker geeignet zu sein. Zielsetzung der Studie war, die Prävalenz der Genalterationen von HER2 und TOP2A festzustellen und anhand des klinischen Verlaufs den prognostischen und prädiktiven Wert von TOP2A für die Anthrazyklintherapie in einem trastuzumabnaiven Kollektiv zu untersuchen.

MATERIAL UND METHODEN: Das Studienkollektiv umfasste 128 Patientinnen, die in den Jahren 2003 und 2004 wegen eines invasiven Mammakarzinoms behandelt worden waren. Primäre Endpunkte waren das rezidivfreie Überleben (DFS) und Überleben (OS). Die mittels FISH-Analyse bestimmten Genalterationen wurden mit dem klinischen Verlauf, der erhaltenen zytostatischen Therapie und dem Rezidivrisiko korreliert.

ERGEBNISSE: Von 128 Tumorproben wiesen 7 eine TOP2A-Amplifikation (5,47%) und 20 (15,63%) eine HER2-Amplifikation auf. Die TOP2A-Amplifikationen gingen immer mit einer Koamplifikation mit HER2 einher. Die koamplifizierten Tumore weisen wegen des HER2-Status und Lymphknotenpositivität ein erhöhtes Rezidivrisiko auf. Andererseits waren alle koamplifizierten Tumore endokrin sensitiv (100%). Alle Hochrisiko-Patientinnen, unabhängig vom Genstatus, profitierten von einer anthrazyklinbasierten Therapie (Überleben: 62 mit CHT vs. 47 Monate ohne CHT). Im mittleren Risikobereich zeigten nur die allein HER2-positiven Tumore einen Benefit (OS: 60 Monate mit

CHT vs. 52 Monate ohne CHT). Die Überlebenszeiten bei Koamplifikation im Vergleich zur allein HER2-positiven Erkrankung sind auch bei fehlender zytostatischer Therapie verlängert (OS: 59 Monate mit CHT vs. 50 Monate ohne CHT). Die TOP2A-Amplifikation konnte nicht als Prädiktor für die anthrazyklinbasierte Therapie bestätigt werden.

DISKUSSION: Die niedrige Prävalenz der TOP2A-Amplifikation erschwert die Bewertung als prognostischen bzw. prädiktiven Marker und erfordert großangelegte Studienkollektive. Einerseits wird durch den HER2-Status und den Lymphknotenbefall ein erhöhtes Risiko, andererseits durch die Hormonrezeptorpositivität und die numerisch verlängerten Überlebenszeiten ein geringeres Rückfallrisiko impliziert. Die Möglichkeit einer günstigeren Tumorbilogie wurde in bisherigen Studien nicht ausreichend berücksichtigt.

SCHLUSSFOLGERUNG: Die TOP2A-Amplifikation als therapierelevanter prädiktiver Faktor für die Auswahl einer anthrazyklinbasierten adjuvanten Chemotherapie bleibt unsicher. Die derzeitige Studienlage hat bisher zu keinen eindeutigen Ergebnissen führen können. Es fehlen derzeit äquieffektive anthrazyklinsparende Chemotherapieregime, um den prädiktiven Wert sicher zu evaluieren. Außerdem muss bei der Auswahl des Kollektivs die Heterogenität der Erkrankung, beispielsweise im Sinne der intrinsischen Subtypen, stärker berücksichtigt werden. Dann kann der TOP2A-Status erneut als Prädiktor untersucht werden und stellt sich möglicherweise als entscheidendes Kriterium für die anthrazyklinbasierte Therapie heraus.

6 SUMMARY

INTRODUCTION: Adjuvant systemic therapy of HER2-positive breast cancer may cause two distinct different cardiotoxic side effects due to anthracycline based chemotherapy and anti-HER therapy with trastuzumab as well. In order to reduce these side effects and to ensure the optimal outcome benefit in survival a predictive marker for anthracycline based therapy is needed. TopoisomeraseII α as target of anthracyclines seems to be eligible as such a predictive marker. The rationale of the study was to evaluate the prevalence of HER2 and TOP2A amplification as well as to analyze the prognostic and predictive value for anthracycline based therapy in a routine treatment collective outside of the setting of a clinical trial and before introduction of Trastuzumab.

MATERIAL AND METHODS: The study group included 128 patients, who were treated due to breast cancer at the Städtische Kliniken Offenbach/ Main in the years 2003 and 2004. Primary endpoints were diseasefree survival (DFS) and overall survival (OS). Gene alterations asserted by Fish-analysis were correlated with the clinical course, received chemotherapy, and assumed risk of recurrence.

RESULTS: Among 128 tissue samples 7 (5,47%) revealed TOP2A amplification and 20 (15,63%) samples were found to be positive for HER2 amplification. All TOP2A amplified tumors were found to be HER2-positive by amplification. Coamplification came along with a higher risk of recurrence due to HER2 positivity and lymphnode involvement. On the other hand all coamplified tumors were found to be hormone positive (100%). All high risk patients irrespective of genalteration showed benefit from anthracycline based therapy (Overall survival/ OS: 62 w/ chemotherapy vs. 47 months w/o). Among patients with medium risk of recurrence benefit of anthracycline based therapy was restricted to HER2 positive disease (OS: 60 w/ vs. 52 months w/o). Survival of patients with coamplified tumors exceeded those with HER2 amplified tumors even when

lacking chemotherapy (OS: 59 w/ vs. 50 months w/o). TOP2A-amplification could not be confirmed as a predictive marker for anthracycline based therapy.

DISCUSSION: The low prevalence of TOP2A amplification complicates the evaluation as a prognostic resp. predictive marker and demands for prospective randomized studies with large scale collectives. On the one hand HER2 and lymphnode positivity imply a high risk of recurrence, on the other hand endocrine responsiveness and prolonged relapse time hypothesize a lower risk of recurrence. A more favorable tumorbiology in coamplified breast cancer has not been adequately considered so far.

CONCLUSION: The significance of TOP2A amplification as a predictive marker for anthracycline based therapy remains insecure. Current data could not confirm any evidence. To evaluate the predictive value of TOP2A amplification there is a need for equivalent anthracycline free regime of chemotherapy. In addition while selecting a study group heterogeneity of breast cancer disease for example as defined by intrinsic subtypes has to be respected. In compliance of these requirements TOP2A may prove as the crucial criterium for anthracycline based chemotherapy.

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AC	Adriamycin+Cyclophosphamid
AC-T	Adriamycin +Cyclophosphamid- Taxan
AC-TH	Adriamycin +Cyclophosphamid- Taxan + Trastuzumab
Aq.dest	Destilliertes Wasser
CEP 17	Centromer des Chromosom 17
CHT	Chemotherapie
CMF	Cyclophosphamid+ Metotrexat + 5-Fluoruracil
CRCD	Chemotherapy Related Cardiac Dysfunction
DAPI	4'6 diamidino-2-phenylindole 2HCl
DFS	Disease Free Survival, Krankheitsfreies Überleben
EBCTCG	Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group alias Oxford Overview
EC	Epirubicin + Cyclophosphamid
EGF	Epidermal Growth Factor
ER	Östrogenrezeptor
FISH	Fluoreszenz in situ Hybridisierung
GnRH	Gonadotropin Releasing Hormon
HCl	Salzsäure
HE	Hämatoxylin-Eosin Färbung
HER	Human Epidermal Growth Factor-Receptor
HER2	Gen, das den HER2- Rezeptor verschlüsselt
HPF	High Power Fields
IHC	Immunhistochemische Untersuchung
IRS	Immunreaktiver Score
JÜR	Jahresüberlebensrate
M	Metastasen
mRNA	Messenger RNA

NaOH	Natronlauge
NP40	Nonidet P40, Octyphenolpolyethylenglycolether
OS	Overall Survival/ Überleben
PBS	Phosphat buffered Saline/ Phosphat gepufferte Kochsalzlösung
pCR	pathological Complete Response/ pathologisch Komplettremission
pN	Lymphknotenstatus
PR	Progesteronrezeptor
pT	Tumorstatus
RT-qPCR	Real Time quantitative Polymerase Chain Reaktion
SSC	Saline Sodium Citrate/ Citratpuffer
TAC	Taxan+ Doxorubicin+ Cyclophosphamid
TCH	Taxan+ Carboplatin +Trastuzumab
TOP2A	Gen, das Topoisomerase II α verschlüsselt
TNBC	Triple Negative Breast Cancer/ Hormon- und HER2 negatives Mammakarzinom

LITERATURVERZEICHNIS

1. **Aebi, S.** Special issues related to the adjuvant therapy in very young women. *Breast*. 2005; 14: 594–99.
2. **Alroy, I, Yarden, Y.** The ErbB signaling network in embryogenesis and oncogenesis: signal diversification through combinatorial ligand-receptor interactions. *FEBS lett.* 1997; 410: 83–86.
3. **Arriola, E, Rodriguez-Pinilla, S, Lambros, M, et al.** Topoisomerase II alpha amplification may predict benefit from adjuvant anthracyclines in HER2 positive early breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2007; 106: 181–89.
4. **Banda, M, Speyer, C, Semma, S, et al.** Metabotropic glutamate receptor-1 contributes to progression in triple negative breast cancer. *PLoS ONE* 2014; 9: e81126.
5. **Bartlett, J, Munro, A, Cameron, D, et al.** Type 1 receptor tyrosine kinase profiles identify patients with enhanced benefit from anthracyclines in the BR9601 adjuvant breast cancer chemotherapy trial. *J. Clin. Oncol.* 2008; 26: 5027–35.
6. **Bender R.** Multiple Regression. *Dtsch Med Wochenschr* 2007; 132: e30–32.
7. **Blum, R.** Adriamycin. *Ann Intern Med* 1974; 80: 249.
8. **Bundred, N.** Prognostic and predictive factors in breast cancer. *Cancer Treat Rev.* 2001; 27: 137–42.
9. **Callagy, G, Pharoah, P, Chin, S, et al.** Identification and validation of prognostic markers in breast cancer with the complementary use of array-CGH and tissue microarrays. *J. Pathol.* 2005; 205: 388–96.
10. **Carter, C, Allen, C, Henson, D.** Relation of tumor size, lymph node status, and survival in 24,740 breast cancer cases. *Cancer.* 1989; 63: 181–87.
11. **Crone, S, Zhao, Y, Fan, L, et al.** ErbB2 is essential in the prevention of dilated cardiomyopathy. *Nat Med.* 2002; 8: 459–65.

12. **Curtis RE.** New Malignancies Among Cancer Survivors: SEER Cancer Registries, 1973-2000. NIH Publ. No. 05-5302. Bethesda, MD, 2006. Bethesda, 2006.
13. **Davidson, M, Würtz, S, Rømer, M, et al.** TIMP-1 gene deficiency increases tumour cell sensitivity to chemotherapy-induced apoptosis. *Brit J Canc.* 2006; 95: 1114-20.
14. **Davies, C, Godwin, J, Gray, R, et al.** Relevance of breast cancer hormone receptors and other factors to the efficacy of adjuvant tamoxifen: patient-level meta-analysis of randomised trials. *Lancet.* 2011; 378: 771–84.
15. **DeLaurentiis M, C.** Her2 Expression and anthracycline effect: results from the Naples GUN3 randomized trial. *Proc Am Soc Clin Oncol* 2001; 20: Abstract 133.
16. **DeSantis, C, Siegel, R, Bandim Priti, et al.** Breast Cancer Facts & Figures 2011-2012. *A Cancer Journal for Clinicians* 2011; 61: 409–18.
17. **DeSantis, C, Ma, J, Bryan, L, et al.** Breast Cancer Facts & Figures 2013-2014. *A Cancer Journal for Clinicians* 2014; 64: 52–62.
18. **Desmedt, C, Azambuja, E de, Larsimont, D, et al.** Predicting the efficacy of anthracyclines in breast cancer (BC) patients: Results of the neoadjuvant TOP trial. Poster Discussion, Breast Cancer - Local-Regional and Adjuvant Therapy. *J. Clin. Oncol.* 2009; 27: 15.
19. **Dhesy-Thind, B, Pritchard, Æ.** HER2/neu in systemic therapy for women with breast cancer: a systematic review. *Breast Cancer Res. Treat.* 2008; 2008: 209–29.
20. **DiLeo, A, Larsimont, D, Gancberg, D, et al.** HER-2 and topo-isomerase IIalpha as predictive markers in a population of node-positive breast cancer patients randomly treated with adjuvant CMF or epirubicin plus cyclophosphamide. *Ann. Oncol.* 2001; 12: 1081–89.
21. **DiLeo, A, Gancberg, D, Larsimont, D, et al.** HER-2 amplification and topoisomerase IIalpha gene aberrations as predictive markers in node-positive breast cancer patients randomly treated either with an anthracycline-based therapy or with cyclophosphamide, methotrexate, and 5-fluorouracil. *Clin. Cancer Res.* 2002; 8: 1107–16.

22. **DiLeo, A, Isola, J.** Topoisomerase II α as a Marker Predicting the Efficacy of Anthracyclines in Breast Cancer: Are We at the End of the Beginning? *Clin Breast Cancer*. 2003; 179–86.
23. **DiLeo, A, Desmedt C., Bartlett JM, et al.** Final results of a meta-analysis testing HER2 and topoisomerase II{alpha} genes as predictors of incremental benefit from anthracyclines in breast cancer. 2010 ASCO Annual Meeting Proceedings. *J. Clin. Oncol.* 2010; 28.
24. **Durbecq, V, Desmed, C, Paesmans, M, et al.** Correlation between topoisomerase-IIalpha gene amplification and protein expression in HER-2 amplified breast cancer. *Int. J. Oncol.* 2004; 25: 1473–79.
25. **Durbecq, V, Paesmans, M, Cardoso, F, et al.** Topoisomerase-II alpha expression as a predictive marker in a population of advanced breast cancer patients randomly treated either with single-agent doxorubicin or single-agent docetaxel. *Mol. Cancer Ther.* 2004; 3: 1207–14.
26. **EBCTCG.** Polychemotherapy for early breast cancer: an overview of the randomised trials. *Lancet*. 1998; 352: 930–42.
27. **EBCTCG.** Favourable and unfavourable effects on long-term survival of radiotherapy for early breast cancer: an overview of the randomised trials. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group. *Lancet* 2000; 355 (9217):1757-1770. *Lancet*. 2000; 355: 1757–70.
28. **EBCTCG.** Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials. *Lancet*. 2005; 365: 1687–717.
29. **EBM Reviews.** Multi-agent chemotherapy for early breast cancer. 2003; 3. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2003; 3.
30. **Ejlertsen B, J.** HER2, TOP2A, and TIMP-1 and Responsiveness to Adjuvant Anthracycline-Containing Chemotherapy in High-Risk Breast Cancer Patients. *J. Clin. Oncol.* 2009; 28: 984–90.
31. **Ellis I. O.** Pathological prognostic factors in breast cancer. II. Histological type. Relationship with survival in a large study with long-term follow-up. *Histopathology*. 1992; 6: 479–89.

32. **Elston C. W., E.** Pathological prognostic factors in breast cancer.: The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology*. 1991; 19: 403–10.
33. **Ernst, A, Soltermann, A, Sigrist, J, et al.** Ectopic expression of human topoisomerase IIalpha fragments and etoposide resistance in mammalian cells. *Int. J. Cancer* 2000; 88: 99–107.
34. **Espinoza T.** Herceptest- Interpretation Manual-Breast. Glostrup Denmark, 2002.
http://www.dako.com/de/28630_19feb10_herceptest_interpretation_manual-breast_ihc_final.pdf.
35. **Ewer, M, Vooletich, M, Durand, J, et al.** Reversibility of trastuzumab-related cardiotoxicity: new insights based on clinical course and response to medical treatment. *J. Clin. Oncol.* 2005; 23: 7820–26.
36. **Ewer, M, Lippman, S.** Type II chemotherapy-related cardiac dysfunction: time to recognize a new entity. *J. Clin. Oncol.* 2005; 23: 2900–02.
37. **Ewer, M, Swain, S, Cardinale, D, et al.** Cardiac dysfunction after cancer treatment. *Tex Heart Inst J.* 2011; 38: 248–52.
38. **Ewer, S, Ewer, M.** Cardiotoxicity profile of trastuzumab. *Drug Saf* 2008; 31: 459–67.
39. **Fisher, E, Anderson, S, Redmond, C, et al.** Pathologic findings from the National Surgical Adjuvant Breast Project protocol B-06. 10-year pathologic and clinical prognostic discriminants. *Cancer*. 1993; 71: 2507–14.
40. **Gennari, A.** HER2 Status and Efficacy of Adjuvant Anthracyclines in Early Breast Cancer: A Pooled Analysis of Randomized Trials. *J Natl Cancer Inst.* 2008; 100: 14–21.
41. **Going JJ.** Breast Cancer Grading, 2005.
www.cancerscreening.nhs.uk/breastscreen/publications/nhsbsp58-poster.pdf.
42. **Goldhirsch, A, Gelber, R, Yothers, G, et al.** Adjuvant therapy for very young women with breast cancer: need for tailored treatments. *J. Natl. Cancer Inst. Monographs* 2001; 30: 44–51.

43. **Goldhirsch, A.** Meeting highlights: updated international expert consensus on the primary therapy of early breast cancer. *J. Clin. Oncol.* 2003; 21: 3357–65.
44. **Goldhirsch, A, Glick, J, Gelber, R, et al.** Meeting Highlights: International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2005. *Ann. Oncol.* 2005; 16: 1569–83.
45. **Goldhirsch, A, Wood, W, Gelber, R, et al.** Progress and promise: highlights of the international expert consensus on the primary therapy of early breast cancer 2007. *Ann. Oncol.* 2007; 18: 1133–44.
46. **Goldhirsch, A, Wood, W, Coates, A, et al.** Strategies for subtypes--dealing with the diversity of breast cancer: highlights of the St. Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2011. *Ann. Oncol.* 2011; 22: 1736–47.
47. **Goldhirsch, A, Winer, E, Coates, A, et al.** Personalizing the treatment of women with early breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2013. *Ann. Oncol.* 2013; 24: 2206–23.
48. **Goswami PC, S.** Cell Cycle-coupled Variation in Topoisomerase II α mRNA Is Regulated by the 3'-Untranslated Region. *J Biol Chem.* 2000; 275: 38384–92.
49. **Gudkov, A, Zelnick, C, Kazarov, A, et al.** Isolation of genetic suppressor elements, inducing resistance to topoisomerase II-interactive cytotoxic drugs, from human topoisomerase II cDNA. - PubMed - NCBI. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993; 90: 3231–35.
50. **Hall, J, King, M.** PCR detection of an MboI polymorphism in the ERBB2 (HER2; NEU) gene on chromosome 17q11.2-q12. *Nucleic Acids Res.* 1991; 19: 2515.
51. **Harris, L.** Topoisomerase II α amplification does not predict benefit from dose-intense cyclophosphamide, doxorubicin, and fluorouracil therapy in HER2-amplified early breast cancer: results of CALGB 8541/150013. *J. Clin. Oncol.* 2009; 27: 3430–36.

52. **Hayes, D, Isaacs, C, Stearns, V.** Prognostic factors in breast cancer: current and new predictors of metastasis. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2001; 6: 375–92.
53. **Hoff, D von, Layard, M, Basa, P, et al.** Risk factors for doxorubicin-induced congestive heart failure. *Ann. Intern. Med.* 1979; 91: 710–17.
54. **Huober, J, Minckwitz, G von, Denkert, C, et al.** Effect of neoadjuvant anthracycline-taxane-based chemotherapy in different biological breast cancer phenotypes: overall results from the GeparTrio study. *Breast Cancer Res. Treat.* 2010; 124: 133–40.
55. **Ishida, R, Sato, M, Narita, T, et al.** Inhibition of DNA topoisomerase II by ICRF-193 induces polyploidization by uncoupling chromosome dynamics from other cell cycle events. *J. Cell Biol.* 1994; 126: 1341–51.
56. **Jacot W.** The HER2 amplicon in breast cancer: Topoisomerase IIA and beyond. *Biochim Biophys Acta.* 2013; 1836: 146–57.
57. **Järvinen, T, Tanner, M, Bärlund, M, et al.** Characterization of topoisomerase II alpha gene amplification and deletion in breast cancer. *Genes Chromosomes Cancer.* 1999; 26: 142–50.
58. **Järvinen, T, Liu, E.** HER-2/neu and topoisomerase IIalpha in breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* 2003; 78: 299–311.
59. **Järvinen, T, Liu, E.** HER-2/neu and topoisomerase IIalpha--simultaneous drug targets in cancer. *Comb. Chem. High Throughput Screen.* 2003; 6: 455–70.
60. **Järvinen, T, Liu, E.** Topoisomerase IIalpha gene (TOP2A) amplification and deletion in cancer--more common than anticipated. *Cytopathology* 2003; 14: 309–13.
61. **Jemal, A, Bray, F, Center, M, et al.** Global Cancer Facts and Figures 2011. *A Cancer Journal for Clinicians* 2011; 61: 69–90.
62. **Jobson, A, Willmore, E, Tilby, M, et al.** Effect of phenazine compounds XR11576 and XR5944 on DNA topoisomerases. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 2009; 63: 889–901.
63. **Knoop, A, Knudsen, H, Balslev, E, et al.** Retrospective analysis of topoisomerase IIa amplifications and deletions as predictive markers in primary breast cancer patients randomly assigned to cyclophosphamide, methotrexate, and

fluorouracil or cyclophosphamide, epirubicin, and fluorouracil: Danish Breast Cancer Cooperative Group. *J. Clin. Oncol.* 2005; 23: 7483–90.

64. **Knoop, A, Knudsen, H, Balslev, E, et al.** TOP2A aberrations as predictive and prognostic marker in high-risk breast cancer patients. A randomized DBCG Trial (DBCG89D). *J. Clin. Oncol.* 2006; 24: Abstract 532.

65. **Kokkinakis, D, Liu, X, Chada, S, et al.** Modulation of gene expression in human central nervous system tumors under methionine deprivation-induced stress. *Cancer Res.* 2004; 64: 7513–25.

66. **Le Deley, M, Suzan, F, Cutuli, B, et al.** Anthracyclines, mitoxantrone, radiotherapy, and granulocyte colony-stimulating factor: risk factors for leukemia and myelodysplastic syndrome after breast cancer. *J. Clin. Oncol.* 2007; 25: 292–300.

67. **Lefrak, E, Pitha, J, Rosenheim, S, et al.** A clinicopathologic analysis of adriamycin cardiotoxicity. *Cancer.* 1973; 32: 302–14.

68. **Lehmann, U, Glöckner, S, Kleeberger, W, et al.** Detection of gene amplification in archival breast cancer specimens by laser-assisted microdissection and quantitative real-time polymerase chain reaction. *Am. J. Pathol.* 2000; 156: 1855–64.

69. **Leitlinienprogramm Onkologie der AWMF, Deutschen Krebsgesellschaft e. v. und Deutsche Krebshilfe e. V.** Interdisziplinäre S3-Leitlinie für die Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms Langversion, 2012. http://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/032-045OL_1_S3__Brustkrebs_Mammakarzinom_Diagnostik_Therapie_Nachsorge_2012-07.pdf.

70. **Liu, X, Taube, M, Jung, K, et al.** Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-1 Protects Human Breast Epithelial Cells from Extrinsic Cell Death: A Potential Oncogenic Activity of Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-1. *Cancer Res.* 2005; 65: 898–906.

71. **Ludwig, J, Weinstein, J.** Biomarkers in cancer staging, prognosis and treatment selection. *Nature reviews. Cancer* 2005; 5: 845–56.

72. **Mano, M, Rosa, D, Azambuja, E de, et al.** The 17q12-q21 amplicon: Her2 and topoisomerase-IIalpha and their importance to the biology of solid tumours. *Cancer Treat. Rev.* 2007; 33: 64–77.
73. **Meng.** Correlations of TOP2A gene aberrations and expression of topoisomerase II α protein and TOP2A mRNA expression in primary breast cancer: a retrospective study of 86 cases using fluorescence in situ hybridization and immunohistochemistry. *Pathol. Int.* 2012; 62: 391–99.
74. **Mirza, A, Mirza, N, Vlastos, G, et al.** Prognostic factors in node-negative breast cancer: a review of studies with sample size more than 200 and follow-up more than 5 years. *Ann Surg.* 2002; 235: 10–26.
75. **Mueller, R, Parkes, R, Andrulis, I, et al.** Amplification of the TOP2A gene does not predict high levels of topoisomerase II alpha protein in human breast tumor samples. *Genes Chromosomes Cancer.* 2004; 39: 288–97.
76. **Negro, A, Brar, B, Lee, K.** Essential roles of Her2/erbB2 in cardiac development and function. *Recent Prog. Horm. Res.* 2004; 59: 1–12.
77. **Oakman, C, Moretti, E, Galardi, F, et al.** The role of topoisomerase IIalpha and HER-2 in predicting sensitivity to anthracyclines in breast cancer patients. *Cancer Treat. Rev.* 2009; 35: 662–67.
78. **Olayioye, M, Neve, R, Lane, H, et al.** The ErbB signaling network: receptor heterodimerization in development and cancer. *EMBO J.* 2000; 19: 3159–67.
79. **Oloumi A, M.** Changes in Subcellular Distribution of Topoisomerase IIa Correlate with Etoposide Resistance in Multicell Spheroids and Xenograft Tumors1. *Cancer Res.* 2000; 60: 5747–53.
80. **O'Malley, F, Chia, S, Tu, D, et al.** Topoisomerase II alpha and responsiveness of breast cancer to adjuvant chemotherapy. *J Natl Cancer Inst.* 2009; 101: 644–50.
81. **Orlando, L, Del Curto, B, Gandini, S, et al.** Topoisomerase IIalpha gene status and prediction of pathological complete remission after anthracycline-based neoadjuvant chemotherapy in endocrine non-responsive Her2/neu-positive breast cancer. *Breast* 2008; 17: 506–11.

82. **Osheroff, N, Corbett, A, Robinson, M.** Mechanism of action of topoisomerase II-targeted antineoplastic drugs. *Adv. Pharmacol.* 1994; 29B: 105–26.
83. **Page, D, Jensen, R, Simpson, J.** Routinely available indicators of prognosis in breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* 1998; 51: 195–208.
84. **Paik, B.** erbB-2 and Response to Doxorubicin in Patients With Axillary Lymph Node-Positive, Hormone Receptor- Negative Breast Cancer. *J Natl Cancer Inst.* 1998; 90: 1361–70.
85. **Park, K, Han, S, Gwak, G, et al.** Topoisomerase II-alpha gene deletion is not frequent as its amplification in breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* 2006; 98: 337–42.
86. **Perez, E, Press, M, Dueck, A, et al.** Immunohistochemistry and fluorescence in situ hybridization assessment of HER2 in clinical trials of adjuvant therapy for breast cancer (NCCTG N9831, BCIRG 006, and BCIRG 005). *Breast Cancer Res. Treat.* 2013; 138: 99–108.
87. **Perou, C, Sørli, T, Eisen, M, et al.** Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 2000; 406: 747–52.
88. **Peto, R, Davies, C, Godwin, J, et al.** Comparisons between different polychemotherapy regimens for early breast cancer: meta-analyses of long-term outcome among 100,000 women in 123 randomised trials. *Lancet.* 2012; 379: 432–44.
89. **Pietras, R, Fendly, B, Chazin, V, et al.** Antibody to HER-2/neu receptor blocks DNA repair after cisplatin in human breast and ovarian cancer cells. *Oncogene* 1994; 9: 1829–38.
90. **Prat, A, Perou, C.** Deconstructing the molecular portraits of breast cancer. *Mol Oncol.* 2011; 5: 5–23.
91. **Press, M.** HER-2/neu gene amplification characterized by fluorescence in situ hybridization: poor prognosis in node-negative breast carcinomas. *J. Clin. Oncol.* 1997; 15: 2894–904.
92. **Press, M, Sauter, G, Buyse, M, et al.** Alteration of topoisomerase II-alpha gene in human breast cancer: association with responsiveness to anthracycline-based chemotherapy. *J. Clin. Oncol.* 2011; 29: 859–67.

93. **Pritchard, K, Shepherd, L, O'Malley, F, et al.** HER2 and Responsiveness of Breast Cancer to Adjuvant Chemotherapy. *N Engl J Med.* 2006; 354: 2103–11.
94. **Remmele, W, Stegner, H.** [Recommendation for uniform definition of an immunoreactive score (IRS) for immunohistochemical estrogen receptor detection (ER-ICA) in breast cancer tissue]. *Pathologe* 1987; 8: 138–40.
95. **Robert- Koch Institut.** Krebs in Deutschland 2005/2006. Häufigkeiten und Trends. 7. Ausgabe. Robert Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg). Berlin, 2010
96. **Robert-Koch Institut.** Brustkrebs: Gesundheitsberichtserstattung des Bundes. Robert Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg). Berlin, 2005.
97. **Robert-Koch Institut.** Krebs in Deutschland 2009/2010. 9. Ausgabe. Robert Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg). Berlin, 2013
98. **Rody, A, Karn, T, Ruckhäberle, E, et al.** Gene expression of topoisomerase II alpha (TOP2A) by microarray analysis is highly prognostic in estrogen receptor (ER) positive breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* 2009; 113: 457–66.
99. **Romero, A, Martín, M, Cheang, M, et al.** Assessment of Topoisomerase II α status in breast cancer by quantitative PCR, gene expression microarrays, immunohistochemistry, and fluorescence in situ hybridization. *Am. J. Pathol.* 2011; 178: 1453–60.
100. **Rosen, P, Groshen, S, Kinne, D, et al.** Factors influencing prognosis in node-negative breast carcinoma: analysis of 767 T1N0M0/T2N0M0 patients with long-term follow-up. *J. Clin. Oncol.* 1993; 11: 2090–100.
101. **Ross JS, F.** HER-2/neu (c-erb-B2) gene and protein in breast cancer. *Am. J. Clin. Pathol.* 1999; 112: 53–67.
102. **Rüschhoff.** Aktuelles zur ErbB2-Diagnostik beim Mammakarzinom ErbB2 diagnostics in breast cancer – an update. *Pathologe* 2009; 30: 147–55.

103. **Ryberg M, N.** Epirubicin cardiotoxicity: an analysis of 469 patients with metastatic breast cancer. *J. Clin. Oncol.* 1998; 16: 3502–08.
104. **Sauter G, J.** Guidelines for Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Testing: Biologic and Methodologic Considerations. *J. Clin. Oncol.* 2009; 8: 1323–33.
105. **Schneider, E, Horton, J, Yang, C, et al.** Multidrug resistance-associated protein gene overexpression and reduced drug sensitivity of topoisomerase II in a human breast carcinoma MCF7 cell line selected for etoposide resistance. *Cancer Res.* 1994; 54: 152–58.
106. **Schnitt, S.** Traditional and newer pathologic factors. *J. Natl. Cancer Inst. Monographs* 2001: 22–26.
107. **Schrohl, A, Meijer-van Gelder, M, Holten-Andersen, M, et al.** Primary Tumor Levels of Tissue Inhibitor of Metalloproteinases-1 Are Predictive of Resistance to Chemotherapy in Patients with Metastatic Breast Cancer. *Clin. Cancer Res.* 2006; 12: 7054–58.
108. **Seidman, A.** Cardiac Dysfunction in the Trastuzumab Clinical Trials Experience. *J. Clin. Oncol.* 2002; 20: 1215–21.
109. **Siegel, R, Miller, K, Jemal, A.** American Cancer Society. Cancer Facts & Figures 2015.
. *A Cancer Journal for Clinicians* 2015; 65: 5–29.
110. **Slamon, D, Clark, G, Wong, S, et al.** Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science.* 1987; 235: 177–82.
111. **Slamon, D, Godolphin, W, Jones, L, et al.** Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. *Science (New York, N.Y.)* 1989; 244: 707–12.
112. **Slamon, D.** Adjuvant Trastuzumab in HER2-Positive Breast Cancer. *N Engl J Med* 2011; 365: 1273–83.
113. **Suter, T, Cook-Bruns, N, Barton, C.** Cardiotoxicity associated with trastuzumab (Herceptin) therapy in the treatment of metastatic breast cancer. *Breast* 2004; 13: 173–83.

114. **Swain, S, Whaley, F, Ewer, M.** Congestive heart failure in patients treated with doxorubicin: a retrospective analysis of three trials. *Cancer*. 2003; 97: 2869–79.
115. **Tanner, M, Järvinen, P, Isola, J.** Amplification of HER-2/neu and topoisomerase II α in primary and metastatic breast cancer. *Cancer Res*. 2001; 61: 5345–48.
116. **Treeck, O, Zhou, R, Diedrich, K, et al.** Tamoxifen long-term treatment in vitro alters the apoptotic response of MCF-7 breast cancer cells. *Anticancer Drugs* 2004; 15: 787–93.
117. **Treszezamsky AD, K.** BRCA1- and BRCA2-Deficient Cells Are Sensitive to Etoposide- Induced DNA Double-Strand Breaks via Topoisomerase II. *Cancer Res*. 2007; 67.
118. **Tubbs, R, Barlow, W, Budd, G, et al.** Outcome of patients with early-stage breast cancer treated with doxorubicin-based adjuvant chemotherapy as a function of HER2 and TOP2A status. *J. Clin. Oncol*. 2009; 27: 3881–86.
119. **Tzahar, E, Waterman, H, Chen, X, et al.** A hierarchical network of interreceptor interactions determines signal transduction by Neu differentiation factor/neuregulin and epidermal growth factor. *Mol. Cell. Biol*. 1996; 16: 5276–87.
120. **Vera-Román, J, Rubio-Martínez, L.** Comparative assays for the HER-2/neu oncogene status in breast cancer. *Arch. Pathol. Lab. Med*. 2004; 128: 627–33.
121. **Villman, K, Sjöström, J, Heikkilä, R, et al.** TOP2A and HER2 gene amplification as predictors of response to anthracycline treatment in breast cancer. *Acta Oncol* 2006; 45: 590–96.
122. **Weigelt, B, Kreike, B, Reis-Filho, J.** Metaplastic breast carcinomas are basal-like breast cancers: a genomic profiling analysis. *Breast Cancer Res. Treat*. 2009; 117: 273–80.
123. **WHO.** Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of the Breast and Female Genital Organs. *IARC Press*; 2003: 9–112.

124. **Withoff, S, Bijman, M, Stel, A, et al.** Characterization of BIS20x3, a bi-specific antibody activating and retargeting T-cells to CD20-positive B-cells. *Brit J Canc.* 2001; 84: 1115–21.
125. **Wolff, A, Hammond, M Elizabeth H, Hicks, D, et al.** Recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists clinical practice guideline update. *J. Clin. Oncol.* 2013; 31: 3997–4013.
126. **Wolff, A, Blackford, A, Visvanathan, K, et al.** Risk of marrow neoplasms after adjuvant breast cancer therapy: the national comprehensive cancer network experience. *J. Clin. Oncol.* 2015; 33: 340–48.
127. **Yarden, Y.** Biology of HER2 and its importance in breast cancer. *Oncology* 2001; 61 Suppl 2: 1–13.
128. **Young, P.** Anthracycline war: no victor yet. *J Natl Cancer Inst.* 2009; 101: 1171–73.

DANKSAGUNG

Herrn Prof. Dr. med. C. Jackisch danke ich für die Möglichkeit, über ein anspruchsvolles und interessantes Thema promovieren zu dürfen. Insbesondere bin ich ihm sehr dankbar für seine tatkräftige Unterstützung und die Einbringung seiner hohen fachlichen Expertise.

Frau Dr. med. S. Braun danke ich für die engagierte Betreuung und Organisation der Arbeit, die zu großen Teilen in ihrem Institut und mit der eifrigen Hilfe durch sie und ihre Mitarbeiter durchgeführt wurde. Insbesondere gilt hier dem Team der MTAs mein Dank für die zügige und einwandfreie Vorbereitung der Präparate.

Herrn Prof. Dr. med. G. Mal möchte ich für die Möglichkeit danken, die FISH-Analyse in seinem Institut durchführen zu dürfen. Hier gilt insbesondere Herrn Dr. med. R. Heyny-von Haussen mein Dank für die thematische Einführung in die FISH-Analyse, die Einweisung am Fluoreszenz-Mikroskop, die geduldige Hilfe bei der Auswertung des HER2-/TOP2A-Status und die vielen regen Diskussionen zu diesem Thema. Frau Manuela Feiler vom molekular-pathologischen Labor danke ich herzlich für dezidierte Unterweisung in die technische Durchführung der FISH-Analyse.

Außerdem möchte ich allen Patientinnen und niedergelassenen KollegInnen für ihre bereitwillige Unterstützung bei der Erhebung des klinischen Verlaufs danken.

Frau Professor E. Herrmann sowie Herrn Dr. H. Ackermann danke ich für die Unterstützung bei der Anfertigung der statistischen Analysen sowie deren Auswertungen.

Frau Dr. med. W. Weiser möchte ich für die großartige Unterstützung als Fachärztin und Freundin danken, und dafür, dass sie im entscheidenden Moment an mich gedacht hat.

Meinem Ehemann Dr. med. H. Dietzel möchte ich für die regelmäßige Durchsicht der Arbeit und seine stete Motivation und Unterstützung in jeglicher Hinsicht danken.

VERZEICHNIS DER AKADEMISCHEN LEHRER/INNEN:

Meine akademischen Lehrer waren die Damen und Herren Ackermann, Badenhoop, Bechstein, Benzenhöfer, Böhles, Boehncke, Bojunga, Bonzelius, Born, Brandt, Bratzke, Brodt, Burkhardt, Busse, Caspary, Deller, Deppe, Dimmeler, Doerr, Dudziak, Elsner, Gaetje, Gall, Geiger, Geißlinger, Gerlach, Gerlinger, Gille, Groß, Grünwald, Hambeck, Hansmann, Hirche, Hofstetter, Jonas, Jork, Kaiser, Kaufmann M, Kaufmann R, Kempf, Kieslich, Klingebiel, Klinke , König, Korf, Lindhoff-Last, Louwen, Maurer, Marzi, Moritz, Müller-Esterl, Nürnberger, Ochsendorf, Oehlschläger, Ohrloff, Oremek, Pfeilschifter, Plate, Rödel, Rolle, Sader, Saarazin, Schäfer, Schmitz-Rixen, Seifert, Serve, Siefert, Sigusch, Spyridopoulos, Stehle, Steinmetz, Stirn, Trojan, Vogl, Wächtershäuser, Wagner, Wicht, Winckler, Zacharowski, Zanella, Zeiher, Zeuzem, Zielen, Zwißler in Frankfurt/ Main, Billing, Braun, DeGroot, Hoffmann, Jackisch, Klepzig, Weiser in Offenbach/ Main.